

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 9/127	4 C 0 7 6
9/127		47/44	4 C 0 8 4
47/44		47/48	4 H 0 4 5
47/48		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/16		31/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全253頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-524613(P2001-524613)	(71) 出願人	エビミュン、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ, ナンシー リッジ
(86) (22) 出願日	平成12年7月19日 (2000.7.19)		ドライブ 5820, スイート 100
(85) 補正文提出日	平成14年1月18日 (2002.1.18)	(72) 発明者	セッテ, アレッサンドロ アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ, リンダ ローザ アベニュー 5551
(86) 国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 1 9 7 7 4		
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 2 1 1 8 9	(72) 発明者	シドニー, ジョン アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サン ディエゴ, コーテ デ ラ シ エナ 4218
(87) 国際公開日	平成13年3月29日 (2001.3.29)	(74) 代理人	弁理士 大塩 竹志
(31) 優先権主張番号	0 9 / 3 5 7, 7 3 7		最終頁に続く
(32) 優先日	平成11年7月19日 (1999.7.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよび核酸組成物を使用する、C型肝炎ウイルスに対する細胞性免疫応答の誘導

(57) 【要約】

本発明は、HCVエプトープを同定および調製するために、ならびにHCVに対して指向されるエプトープペー
スのワクチンを開発するために、抗原がT細胞によって
認識される機構についての本発明者らの知識を使用す
る。より詳細には、本出願は、薬学的組成物、ならびに
HCV感染の予防および処置における使用の方法につい
ての本発明者らの発見を伝達する。本発明はまた、既知
のHLA型を有する患者におけるHCVへの免疫応答を
モニタリングまたは評価するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 組成物であって、以下：

【化1】

FLLADARV,	YLWAYQATV,	RLIVFPDLGV,
DLMGYIPLV,	WMNRLLAFA,	VLVGGVLAA,
HMWNFISGI,	ILAGYGAGV,	YLLPRRGPR,
LLFLLADA,	YLVTRHADV,	KTSESRQPR,
RLGVRATRK,	QLFTFSPRR,	RMVVGGEVHR,
LIFCHSKKK,	GVAGALVAFK,	VAGALVAFK,
TLFGGAYMSK,	LPGCSFSIF,	LSAFSLHSY,
CTCGSSDLV,	FWAKHMWNF,	SKGWRLAPITAYAQ,
AAAYAAQGYKVLVLNPSVAAT,	GRHLIFCHSKKKCDE,	VVVVATDALMTGYTG,
TVDFSLDPTFTIETT,	NFISGIQYLAGLSTLPGNFA,	
GEGAVQWMNRLLAFASRGNHV, GSSYGFQYSPGQVVE, ASCLRKLGVPPPLRVW,		
および LTCGFADLMGY.		

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、調製されたC型肝炎ウイルス(HCV)エピトープを含む、組成物。

【請求項2】 請求項1に記載の群から選択される2つのエピトープをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 請求項1に記載の群から選択される3つのエピトープをさらに含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 請求項1に記載の組成物であって、ここで、該組成物は、以下：

【化2】

LTDPSHITA,
LADGGCSGGAY, RMILMTHFF, VMGSSYGF, FWAKHMWNFI, LLFNILGGWV,
IPFYGKAI, および VGIYLLPNR.

からなる群から選択されるCTLエピトープをさらに含む、組成物。

【請求項5】 前記組成物が、H T L エピトープをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】 前記H T L エピトープが、汎D R 結合分子である、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記エピトープが、リボソーム上またはリボソーム内にある、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】 前記ペプチドが脂質に結合される、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】 前記エピトープが、H L A 重鎖、 β 2-ミクロglobulin、およびストレパビジン複合体に結合され、それによってテトラマーが形成される、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】 前記エピトープが、抗原提示細胞上のH L A 分子に結合される、請求項1に記載の組成物。

【請求項11】 前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】 前記組成物が薬学的賦形剤をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項13】 前記エピトープがさらに単位用量形態である、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】 組成物であって、以下：

【化3】

FLLADARV, YLVAYQATV, RLIVFPDLGV,
 DLMGYPLV, WMNRLIAFA, VLVGGVLA,
 HMWNFISGI, ILAGYGAGV, YLLPRRGFRL,
 LLFLLADA, YLVTRHADV, KTSERSQPR,
 RLGVRATRK, QLFTFSPPR, RMYVGGVEHR,
 LIFCHSKKK, GVAGALVAFK, VAGALVAFK,
 TLGFGAYMSK, LPGCSFSIF, LSAFSLHSY,
 CTCGSSDLY, FWAKHMWNE, SKGWRLAPITAYAQ,
 AAYAAQGYKVLVLPNSVAAT, GRHLIFCHSKKKCDE, VVVVATDALMTGYTG,
 TVDFSLDPTFTIETT, NFISGIQYLAGLSTLPGNPA,
 GEGAVQWMNRLIAFASRGNHV, GSSYGFQYSPGQRV, ASCLRKLGPPLRVW,
 おおい LTCGFADLMGY.

からなる群から選択される少なくとも2つのC型肝炎ウイルス(HCV)ペプチドエピトープを含む、250アミノ酸残基未満の調製されたペプチドを含む、組成物。

【請求項15】 少なくとも2つのエピトープが、スパーサーを介して連結される、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】 第3のエピトープをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項17】 請求項16に記載の組成物であって、ここで前記第3のエピトープが、以下：

【化4】

LTDPShITA, LADGGCSGGAY, RMILMTHFF,
 VMGSSYGF, FWAKHMWNFI, LLFNILGGWV, IPFYGKAI, おおい VGIYLLPNR.

からなる群から選択される、組成物。

【請求項18】 HTLEピトープである第3のエピトープをさらに含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項19】 前記HTLEピトープが汎用DR結合分子である、請求項

18に記載の組成物。

【請求項20】 前記ペプチドが、リボソーム上またはリボソーム内にある、請求項14に記載の組成物。

【請求項21】 前記ペプチドが脂質に結合される、請求項14に記載の組成物。

【請求項22】 前記ペプチドが、請求項14に記載の群のうちの少なくとも3つのエピトープをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項23】 前記ペプチドが、請求項14に記載の群のうちの少なくとも4つのエピトープをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項24】 前記ペプチドが、請求項14に記載の群のうちの少なくとも5つのエピトープをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項25】 前記ペプチドが、請求項14に記載の群のうちの少なくとも6つのエピトープをさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項26】 前記組成物が薬学的賦形剤をさらに含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項27】 前記エピトープがさらに単位用量形態である、請求項14に記載の組成物。

【請求項28】 少なくとも6つの調製されたHCVエピトープを含む組成物であって、該HCVエピトープの各々が、以下：

【化5】

FLLADARV,	YLVA YQATV,	RLVFPDLGV,
DLMGYIPLV,	WMNRLIAFA,	VLVGGVLA A,
HMWNFISGI,	ILAGYGAGV,	YLLPRRGPR L,
LLFLLADA,	YLVTRHADV,	KTSE RSQPR,
RLGVRATRK,	QLFTFSPRR,	RMVVG GVEHR,
LIFCHSKKK,	GVAGALVAFK,	VAGALVAFK,
TLGFGAYMSK,	LPGCSFSIF,	LSAFSLHSY,
CTCGSSDLY,	FWAKHMWNF,	SKGWRL LAPITAYA Q,
AAYAAQGYKVLVLNPSVAAT,	GRHLIFCHSKKKCDE,	VVVVAITDALMTGYTG,
TVDFSLDPTFTIETT,	NFISGIQYL AGLSTLPGNPA,	
GEGAVQWMNRLIAFASRGNHV,	GSSYGFQYSPGQ RVE,	ASCLRKLGV PPLRVW,
から LTCGFADLMGY.		

からなる群から選択されるアミノ酸からなる、組成物。

【請求項 29】 請求項 28 に記載の組成物であって、以下：

【化 6】

LTDFSHITA, LADGGCSGGAY,
RMILMTHFF, VMGSSYGF, FWAKHMWNFI, LLFNILGGWV, IPFYGKAI, から
VGIYLLPNR.

からなる群から選択される少なくとも 1 つのエピトープをさらに含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(連邦政府によって援助された研究および開発)

本発明は、一部、国立衛生研究所の助成の下で米国政府によって資金援助された。米国政府は、本発明の特定の権利を有する。

【0002】

(索引)

I. 発明の背景

II. 発明の要旨

III. 図面の簡単な説明

IV. 発明の詳細な説明

A. 定義

B. CTL応答およびHTL応答の刺激

C. HLA分子に対するペプチドエпитオプの結合親和性

D. ペプチドエпитオプ結合モチーフおよびスーパーモチーフ (Super motif)

1. HLA-A1スーパーモチーフ

2. HLA-A2スーパーモチーフ

3. HLA-A3スーパーモチーフ

4. HLA-A24スーパーモチーフ

5. HLA-B7スーパーモチーフ

6. HLA-B27スーパーモチーフ

7. HLA-B44スーパーモチーフ

8. HLA-B58スーパーモチーフ

9. HLA-B62スーパーモチーフ

10. HLA-A1モチーフ

11. HLA-A2.1モチーフ

12. HLA-A3モチーフ

13. HLA-A11モチーフ

14. HLA-A24モチーフ

15. HLA-DR-1-4-7スーパーモチーフ

16. HLA-DR3モチーフ

E. ワクチンの増大する集団適用範囲

F. 免疫応答刺激ペプチドエпитープアナログ

G. スーパーモチーフまたはモチーフを含有するエпитープについての、
疾患関連抗原由来のタンパク質配列のコンピュータスクリーニング

H. ペプチドエпитープの調製

I. T細胞応答を検出するためのアッセイ

J. 免疫応答を評価するためのペプチドエпитープの使用

K. ワクチン組成物

1. ミニ遺伝子ワクチン

2. CTLペプチドとヘルパーペプチドとの組合わせ

L. 治療目的または予防目的のためのワクチンの投与

M. キット

V. 実施例

VI. 特許請求の範囲

VII. 要約。

【0003】

(I. 発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、世界的なヒトの健康上の問題であり、米国単独で毎年新たに約150,000件の報告事例がある。HCVは、一本鎖RNAウイルスであり、そして輸血後および移植後の非A型、非B型の肝炎のほとんどの場合に同定される病因因子であり、そして急性散発性肝炎の共通の原因である(Chooら、Science 244:359, 1989; Kuoら、Science 244:362, 1989; および Alterら、Current Perspective in Hepatology, p. 83, 1989)。HCVに感染した患者の50%より多くが、慢性的感染となり、そしてそのうち20%が20年以内に肝硬変を発症することが推定される(Davisら

、New Engl. J. Med. 321:1501, 1989; Alterら、Current Perspective in Hepatology, p. 83, 1989; Alterら、New Engl. J. Med. 327:1899, 1992; および Dienstag, J. L. Gastroenterology 85:430, 1983)。さらに、HCV感染の処置に利用可能な唯一の治療は、インターフェロン- α である。ほとんどの患者は非応答性であるが、応答者の間では、処置の停止の6~12ヶ月以内の高い再発率が存在する(Liangら、J. Med. Virol. 40:69, 1993)。リバビロン(ribavirin)(多くのRNAウイルスおよびDNAウイルスに対して広い範囲の活性を有するグアノシンアナログ)は、インターフェロン- α と組合わせて使用される場合、臨床試行において、慢性HCV感染に対して有効であることが示されてきた(例えば、Poynardら、Lancet 352:1426-1432, 1998; Reichardら、Lancet 351:83-87, 1998を参照のこと)。しかし、応答速度はまだはるかに50%未満である。

【0004】

ウイルス特異的な、ヒト白血球抗原(HLA)クラスI制限の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、インビボのウイルス感染の防止およびクリアランスにおいて主要な役割を果たすことが公知である(Oldstoneら、Nature 321:239, 1989; Jamiesonら、J. Virol. 61:3930, 1987; Yapら、Nature 273:238, 1978; Lukacherら、J. Exp. Med. 160:814, 1994; McMichaelら、N. Engl. J. Med. 309:13, 1983; Sethiら、J. Gen. Virol. 64:443, 1983; Watariら、J. Exp. Med. 165:459, 1987; Yasukawaraら、J. Immunol. 143:2051, 1989; Tiggesら、J. Virol. 66:1622, 1993; Reddenhaseら、J. Virol. 55:263, 1985; Quinnanら、N. Engl. J. Med. 307:6, 1982)。HLAクラスI分子は、ほとんど全ての有核細胞の表面上で発現する

。抗原の細胞内プロセッシングに続いて、抗原由来のエピトープは、このような細胞の表面上のHLAクラスⅠの分子との複合体として提示される。CTLは、ペプチド-HLAクラスⅠ複合体を認識し、次いでこれは、CTLによって直接的にか、そして／またはウイルスの複製を阻害する非破壊的機構（例えば、インターフェロンの産生）の活性化を介して、HLA-ペプチド複合体を有する細胞の破壊をもたらす。

【0005】

HCV感染で観察される異種免疫応答を考慮すると、複数のHCVエピトープに対して同時に指向される多重特異的な細胞性免疫応答の誘導は、HCVに対する有効なワクチンの開発のために重要であると思われる。しかし、HCV感染を清澄する患者に見られる応答に対応する免疫応答を誘発する、ワクチンの実施形態を確立する必要性が存在する。

【0006】

この節において提供される情報は、本出願の出願日のこの分野の現在理解されている状況として開示されることが意図される。本出願の優先日の後に作製された情報が、この節に含まれる。従って、この節の情報は、いずれにしても本発明の優先日を線引きするようには意図されない。

【0007】

（II．発明の要旨）

本発明は、例えば、HCVに対して指向されるエピトープベースのワクチンを開発するために、抗原がT細胞に認識される機構についての本発明者らの知識を適用する。より詳細には、本出願は、特定のエピトープ薬学的組成物ならびにHCV感染の防止および処置における使用方法についての、本発明者らの発見を伝達する。

【0008】

適切な技術の開発の際に、エピトープベースのワクチンの使用は、特に、ワクチン組成物における抗原全体の使用と比較したときに、現在のワクチンを超えたいくつかの利点を有する。抗原全体に対する免疫応答は、抗原の可変領域に対して大部分が指向され、変異に起因する免疫の逸脱を可能にするという証拠が存在

する。エピトープベースのワクチン中に封入するためのエピトープは、ウイルスまたは腫瘍関連抗原の保存領域から選択され、これによって逸脱変異体の可能性が減少する。さらに、抗原全体に存在し得る免疫抑制性エピトープは、エピトープベースのワクチンの使用で回避され得る。

【0009】

エピトープベースのワクチンアプローチのさらなる利点は、選択されるエピトープ（CTLおよびHTL）を組み合わせる能力であり、そしてさらに、例えば、増大した免疫原性を達成するエピトープの組成を改変する能力である。従って、免疫応答は、適切な場合、標的疾患のために調節され得る。応答の同様の操作は、従来のアプローチを用いては可能ではない。

【0010】

エピトープベースの免疫刺激ワクチンの別の主要な利点は、その安全性である。感染性因子またはタンパク質抗原全体（これは、それ自身の固有の生物学的活性を有し得る）によって生じる、起こり得る病理学的な副作用が、排除される。

【0011】

エピトープベースのワクチンはまた、同じ病原由来の複数の選択された抗原に対する免疫応答を指向し、そしてこれに焦点を合わせる能力を提供する。従って、特定の病原に対する免疫応答における患者間の可変性は、ワクチン組成物中の病原から、複数の抗原由来のエピトープを包含することによって軽減され得る。「病原」は、感染性因子または腫瘍関連分子であり得る。

【0012】

しかし、広範に有効なエピトープベースの免疫療法の開発の最も手強い障壁の1つは、HLA分子の極度の多型性である。現在まで、集団の遺伝的に偏りのない有効な適用範囲は、かなりの複雑さの課題である；このような適用範囲は、各個々のHLA対立遺伝子と対応するHLA分子に特異的であるエピトープが使用されることを必要とし、その結果、民族的に多様な集団を網羅するために実施不可能に多数のエピトープが使用されなければならない。従って、エピトープベースのワクチンにおける使用のために複数のHLA抗原分子によって結合されるペプチドエピトープの必要性が存在する。多数のHLA抗原分子が結合すればする

ほど、ワクチンによる集団適用範囲の幅が大きくなる。

【0013】

さらに、本明細書中でより詳細に記載するように、ペプチド結合特性を調節する（例えば、複数のHLA抗原に結合し得るペプチドが、免疫応答を刺激する親和性で結合するように）必要性が存在する。免疫原性と相関する親和性で1つ以上のHLA対立遺伝子によって制限されたエピトープの同定は、集団適用範囲を通して提供するため、そして集団の多様なセグメントにおける感染を防止または清澄するために十分な効力の応答の誘発を可能にするために重要である。このような応答はまた、エピトープの広範な配列を標的化し得る。本明細書中に開示される技術は、このような好ましい免疫応答について提供される。

【0014】

好ましい実施形態において、本発明のワクチン組成物に包含するためのエピトープは、既知の抗原のタンパク質配列がモチーフを有するエピトープまたはスーパーモチーフを有するエピトープの存在について評価されるプロセスによって選択される。次いで、モチーフを有するエピトープまたはスーパーモチーフを有するエピトープに対応するペプチドは、合成され、そして選択されるモチーフを認識するHLA分子に結合する能力について試験される。中程度または高い親和性（すなわち、HLAクラスI分子について500 nM以下、あるいはHLAクラスII分子について1000 nM以下のIC₅₀（またはK_d値））で結合するこれらのペプチドは、CTLまたはHTL応答を誘導するその能力についてさらに評価される。免疫原性ペプチドエピトープは、ワクチン組成物に包含するために選択される。

【0015】

スーパーモチーフを有するペプチドは、HLAスーパータイプファミリー内の複数の対立遺伝子に結合する能力についてさらに試験され得る。さらに、ペプチドエピトープは、結合親和性および／またはHLAスーパータイプ内の複数の対立遺伝子に結合する能力を改変するためにアナログ化（analogued）され得る。

【0016】

本発明はまた、既知のHLA型を有する患者におけるHCVへの免疫応答をモニタリングまたは評価するための方法を含む実施形態を含み、この方法は、患者由来のTリンパ球サンプルを、本質的に表V I I ~ 表X X Xまたは表X X I Iに記載されるアミノ酸配列からなるHCVエпитープ（これは、この患者に存在する少なくとも1つのHLA対立遺伝子の産物に結合する）を含むペプチド組成物と共にインキュベートする工程、およびこのペプチドに結合するTリンパ球の存在を検出する工程を包含する。CTLペプチドエпитープは、例えばテトラマー複合体を含み得る。

【0017】

本発明に従うペプチドエпитープを定義するための代替の様式は、長さ；一次構造；または荷電のような物理的性質（これらは、特定の対立遺伝子特異的HLA分子または対立遺伝子特異的HLA分子の群への結合と相関する）を列挙することである。ペプチドエпитープを定義するためのさらなる様式は、HLA結合ポケットの物理的特性、またはいくつかの対立遺伝子特異的HLA結合ポケットによって共有される特性（例えば、ポケットの配置および電荷分布）を列挙すること、ならびにペプチドエпитープが、このポケットに一致および結合することを説明することである。

【0018】

以下の議論から明らかなように、他の方法および実施形態もまた意図される。さらに、本明細書中に記載されるいずれかの方法によって生成される新規な合成ペプチドもまた、本発明の一部である。

【0019】

（I I I . 図面の簡単な説明）

図1は、平均集団における、HLA-AおよびB分子により結合したHCV候補エпитープの数の関数としての遺伝子型の総頻度のグラフを提供する。

【0020】

図2は、実験モデルのミニ遺伝子構築物中のペプチドエпитープの位置を示す。

【0021】

(I V. 発明の詳細な説明)

本発明のペプチドエпитープおよび対応する核酸組成物は、CTLまたはHTL応答の生成を刺激することによって、HCVに対する免疫応答を刺激するために有用である。このペプチドエпитープ（ネイティブなHCVアミノ酸配列から直接的または間接的に誘導される）は、HLA分子に結合し得、そしてHCVに対する免疫応答を刺激し得る。HCVおよびその改変体由来の完全なポリタンパク質配列は、Genbankから得られ得る。ペプチドエпитープおよびそれらのアナログはまた、以下に提供される開示から明らかであるように、その後にこれまで未知のHCVの改変体について発見され得る配列情報から容易に決定され得る。

【0022】

本発明のペプチドエпитープは、以下に議論されるように多くの方法において同定されてきた。アナログペプチドを誘導し、そしてHLA分子についての結合活性が、改変された免疫原性を示すペプチドアナログを作製するために特定のアミノ酸残基を改変することによって調節されることもまた、詳細に議論される。さらに、本発明は、種々の遺伝的対立遺伝子によりコードされるHLA分子と相互作用し得るエпитープベースのワクチンがこれまでのワクチンより広い範囲の集団を提供することを可能にする、組成物および組成物の組合わせを提供する。

【0023】

(I V. A. 定義)

本発明は、以下の定義に対する言及とともに、より効果的に理解され得る（定義をアルファベット順に列挙する）。

【0024】

「コンピューター」または「コンピューターシステム」は、一般に以下を備える：プロセッサ；少なくとも1つの情報格納／検索装置（例えば、ハードドライブ、ディスクドライブまたはテープドライブのような）；少なくとも1つの入力装置（例えば、キーボード、マウス、タッチスクリーンまたはマイクロフォン）；およびディスプレイ構造。さらに、コンピューターは、ネットワークとつながった通信路を備える。このようなコンピューターは、多かれ少なかれ、上に列挙

したものを含み得る。

【0025】

「交差反応性結合」は、ペプチドが1つより多いHLA分子により結合されることを示す；類義語は、変性結合（degenerate binding）である。

【0026】

「潜在エピトープ」は、単離されたペプチドで免疫されることにより応答を誘発するが、この応答は、このエピトープを含むインタクトな完全なタンパク質が抗原として使用される場合、インビトロで交差反応性でない。

【0027】

「優性エピトープ」は、完全なネイティブな抗原で免疫する際に免疫応答を誘導するエピトープである（例えば、Sercarzら、Annu. Rev. Immunol. 11:729-766, 1993を参照のこと）。このような応答は、単離されたペプチドエピトープとインビトロで交差反応性である。

【0028】

特定のアミノ酸配列に関して、「エピトープ」は、特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、またはT細胞の状況において、T細胞レセプタータンパク質および／または主要組織適合遺伝子複合体（MHC）レセプターによる認識に必要なアミノ酸残基のセットである。免疫系の状況において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子により認識される部位とともに形成する分子の集団的な特色（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造および三次ペプチド構造、ならびに電荷）である。この開示を通して、エピトープおよびペプチドは、しばしば交換可能に用いられる。

【0029】

本発明のエピトープおよびさらなるアミノ酸を含むタンパク質またはペプチド分子は、なお本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。特定の実施形態において、本発明のペプチドの長さに対しては制限がある（さもなければ、構築物ではない）。長さが制限された実施形態は、本発明のエピトープを含むタン

バク質／ペプチドがネイティブな配列と100%同一性を有する領域（すなわち、連続した一続きのアミノ酸）を含む場合に起こる。例えば、完全な天然の分子に対する解釈（reading）からエピトープの規定を避けるために、ネイティブなペプチド配列と100%同一性を有する任意の領域の長さに対しては制限がある。従って、本発明のエピトープを含むペプチドおよびネイティブなペプチド配列と100%同一性を有する領域（さもなくば、構築物ではない）について、ネイティブな配列に対して100%同一性を有する領域は、一般に以下の長さを有する：600アミノ酸以下、しばしば500アミノ酸以下、しばしば400アミノ酸以下、しばしば250アミノ酸以下、しばしば100アミノ酸以下、しばしば85アミノ酸以下、しばしば75アミノ酸以下、しばしば65アミノ酸以下、およびしばしば50アミノ酸以下。特定の実施形態において、本発明の「エピトープ」は、5アミノ酸に至るまでの任意の増分（49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5）において、ネイティブなペプチド配列に対して100%同一性を有する51アミノ酸未満の領域を有するペプチドにより含まれる。

【0030】

従って、600アミノ酸より長いペプチドまたはタンパク質配列は、それらがネイティブなペプチド配列と100%同一性を有する600アミノ酸を超える任意の連続する配列を含まない（さもなくば、構築物ではない）限り、本発明の範囲内にある。ネイティブな配列に対応する5つ以下の連続する残基を有する任意のペプチドについては、本発明の範囲内に入れるために、そのペプチドの最大長さに対する制限はない。CTLエピトープが、8アミノ酸残基に至るまでの任意の増分において600残基長未満であることは現在好ましい。

【0031】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトクラスIまたはクラスIIの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）タンパク質である（例えば、Stitesら、IMMUNOLOGY, 第8版, Lange Publishing, Los

Altos, CA (1994) を参照のこと)。

【0032】

「HLA スーパータイプまたはファミリー」は、本明細書中で使用される場合、共有されたペプチド結合特異性に基づいて分類される HLA 分子のセットを記載する。特定のアミノ酸モチーフを有するペプチドに対していくらかの類似した結合親和性を共有する HLA クラス I 分子は、HLA スーパータイプに分類される。用語 HLA スーパーファミリー、HLA スーパータイプファミリー、HLA ファミリー、および HLA_{xx} 様スーパータイプ分子（ここで、xx は、特定の HLA 型を示す）は、類義語である。

【0033】

本開示全体を通して、結果は「IC₅₀」によって表される。IC₅₀ は、参照ペプチドの結合の 50% 阻害が観察される、結合アッセイにおけるペプチド濃度である。このアッセイが行われる条件（すなわち、制限された HLA タンパク質および標識ペプチド濃度）が与えられると、これらの値は、K_d 値に近似する。結合を決定するためのアッセイは、以下に詳細に記載される（例えば、PCT 公開 WO 94/20127 および WO 94/03205）。IC₅₀ 値は、アッセイ条件が変化する場合、しばしば劇的に変化し得、そして使用される特定の試薬（例えば、HLA の調製物など）に依存することは注意すべきである。例えば、過剰な濃度の HLA 分子は、所定のリガンドの見かけの測定された IC₅₀ を増大させる。

【0034】

あるいは、結合は、参照ペプチドに対して表される。特定のアッセイがより感度が高くなるか、またはより感度が低くなる場合、試験されたペプチドの IC₅₀ はいくらか変化し得るが、参照ペプチドに対する結合は、有意には変化しない。例えば、参照ペプチドの IC₅₀ が 10 倍増大する条件下でのアッセイ実施において、試験ペプチドの IC₅₀ 値はまた、約 10 倍シフトする。従って、曖昧さを回避するために、ペプチドが良好か、中程度か、弱い、またはネガティブなバインダーである否かの評価は、一般に、標準的なペプチドの IC₅₀ に対するその IC₅₀ に基づく。

【0035】

結合はまた、他のアッセイ系を用いて決定され得る。これらのアッセイ系としては、以下を用いるものが挙げられる：生細胞（例えば、Ceppelliniら, *Nature* 339:392, 1989; Christnickら, *Nature* 352:67, 1991; Buschら, *Int. Immunol.* 2:443, 1990; Hillら, *J. Immunol.* 147:189, 1991; del Guercioら, *J. Immunol.* 154:685, 1995）、界面活性剤溶解物を用いる無細胞系（例えば、Cerundoloら, *J. Immunol.* 21:2069, 1991）、固定化された精製MHC（例えば、Hillら, *J. Immunol.* 152, 2890, 1994; Marshallら, *J. Immunol.* 152:4946, 1994）、ELISA系（例えば、Reayら, *EMBO J.* 11:2829, 1992）、表面プラズモン共鳴（例えば、Khilkoら, *J. Biol. Chem.* 268:15425, 1993）、高フラックス可溶性相アッセイ（Hammerら, *J. Exp. Med.* 180:2353, 1994）、およびクラスI MHC安定化またはアセンブリの測定（例えば、Ljunggrenら, *Nature* 346:476, 1990; Schumacherら, *Cell* 62:563, 1990; Townsendら, *Cell* 62:285, 1990; Parkerら, *J. Immunol.* 149:1896, 1992）。

【0036】

本明細書中で使用される場合、HLAクラスI分子に関する「高親和性」は、50 nM以下のIC₅₀またはK_d値を有する結合として規定される；「中程度の親和性」は、約50 nMと約500 nMとの間のIC₅₀またはK_d値を有する結合である。HLAクラスII分子に対する結合に関する「高親和性」は、100 nM以下のIC₅₀またはK_d値を有する結合として規定される；「中程度の親和性」は、約100 nMと約1000 nMとの間のIC₅₀またはK_d値を有する結合である。

【0037】

2つ以上のペプチド配列の状況において、用語「同一」またはパーセント「同

一性」は、比較ウィンドウで最大の対応に関して比較され、そして整列されたとき、配列比較アルゴリズムを用いて、または手動の整列および目視により測定する場合、同じ2つ以上の配列または部分配列、あるいは同じアミノ酸残基の特定の割合を有する2つ以上の配列または部分配列をいう。

【0038】

「免疫原性ペプチド」または「ペプチドエピトープ」は、対立遺伝子特異的モチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドであり、その結果、このペプチドがHLA分子に結合し、そしてCTLおよび/またはHTL応答を誘導する。従って、本発明の免疫原性ペプチドは、適切なHLA分子に結合し得、その後、免疫原性ペプチドが由来する抗原に対するHLA拘束細胞傷害性T細胞またはヘルパーT細胞の応答を誘導し得る。

【0039】

句「単離された」または「生物学的に純粋な」とは、通常は、物質がそのネイティブな形態で見出される場合に、この物質に付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質をいう。従って、本発明に従って単離されたペプチドは、好ましくは、それらのインサイチュ環境において、ペプチドと通常関連する物質を含まない。「単離された」エピトープとは、ペプチドが由来した抗原またはポリペプチドの配列全体を含まないエピトープをいう。代表的には、「単離された」エピトープは、ネイティブな配列と100%同一性を有する配列を生じるさらなるアミノ酸に結合していない。このネイティブな配列は、このエピトープが由来した腫瘍関連抗原のような配列であり得る。

【0040】

「主要組織適合遺伝子複合体」または「MHC」は、生理学的免疫応答を担う細胞相互作用の制御において役制を果たす遺伝子のクラスターである。ヒトにおいて、MHC複合体は、HLA複合体としても公知である。MHC複合体およびHLA複合体の詳細な記載については、Paul, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 第3版, Raven Press, New York, 1993を参照のこと。

【0041】

用語「モチーフ」とは、規定の長さのペプチド（通常は、クラスⅠ HLAモチーフについては約8～約13アミノ酸のペプチドおよびクラスⅡ HLAモチーフについては約6～約25アミノ酸のペプチド）における残基のパターンをいい、これらのモチーフは、特定のHLA分子により認識される。ペプチドモチーフは、代表的には、各ヒトHLA対立遺伝子によりコードされる各タンパク質について異なり、そして一次および二次アンカー残基のパターンが異なる。

【0042】

「ネガティブ結合残基」は、ペプチドエピトープの特定の位置（代表的には一次アンカー位置ではない）に存在した場合、このペプチドの対応するHLA分子に対するペプチドの結合親和性の減少を生じるアミノ酸である。

【0043】

「非ネイティブ」配列または「構築物」とは、天然において見出されない（「天然に存在しない」）配列をいう。このような配列としては、例えば、脂質化ペプチド、そうでなければ改変されたペプチドおよびネイティブなタンパク質配列において連続していないエピトープを含むポリエピトープ組成物が挙げられる。

【0044】

用語「ペプチド」は、本明細書中で「オリゴペプチド」と互換的に使用され、代表的には、隣接するアミノ酸の α -アミノ基とカルボキシル基との間のペプチド結合によって互いに連結された一連の残基（代表的には、L-アミノ酸）を意味する。本発明の好ましいCTL誘導ペプチドは、長さが13残基以下であり、通常、約8残基と約11残基との間で構成され、好ましくは9または10残基である。好ましいHTL誘導オリゴペプチドは、長さが約50残基未満であり、そして通常、約6残基と約30残基との間で構成され、より通常は、約12残基と約25残基との間で構成され、そしてしばしば、約15残基と約20残基との間で構成される。

【0045】

「薬学的に受容可能な」とは、一般に、非毒性の、不活性かつ／または生理学的に適合性の組成物をいう。

【0046】

「薬学的賦形剤」は、アジュバント、キャリア、pH調節剤および緩衝剤、張度調節剤、湿潤剤、防腐剤などのような物質を含む。

【0047】

「一次アンカー残基」は、免疫原性ペプチドとHLA分子との間の接触点を提供すると理解されているペプチド配列に沿った特定の位置でのアミノ酸である。規定された長さのペプチド内の1～3つ（通常、2つ）の一次アンカー残基は、一般に、免疫原性ペプチドについて「モチーフ」を規定する。これらの残基は、HLA分子のペプチド結合溝と最近接で適合し、その側鎖は、結合溝自体の特定のポケットに埋め込まれていることが理解される。1つの実施形態において、一次アンカー残基は、本発明に従う9残基のペプチドエピトープの二位（アミノ末端位置から）およびカルボキシ末端位置に位置する。各モチーフおよびスーパーモチーフの一次アンカー位置は、表1に示される。例えば、アナログペプチドは、これらの一次アンカー位置における特定の残基の存在または非存在を変更することによって作製され得る。そのようなアナログは、特定のモチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドの結合親和性を調節するために使用される。

【0048】

「不規則な認識 (promiscuous recognition)」は、異なるペプチドが種々のHLA分子の状況において同じT細胞クローンにより認識されることである。不規則な認識または結合は、交差反応性結合と類似である。

【0049】

「防御免疫応答」または「治療免疫応答」とは、感染因子または腫瘍抗原由来の抗原に対するCTLおよび/またはHTL応答をいう。この応答は、疾患症状または進行を予防するか、または少なくとも部分的に停止する。この免疫応答はまた、ヘルパーT細胞の刺激により促進される抗体応答を含み得る。

【0050】

用語「残基」とは、アミド結合またはアミド結合模倣物によってオリゴペプチド中に取りこまれているアミノ酸またはアミノ酸模倣物をいう。

【0051】

「二次アンカー残基」は、ペプチドにおける一次アンカー位置以外の位置のアミノ酸であり、これは、ペプチド結合に影響し得る。二次アンカー残基は、1つの位置におけるアミノ酸のランダムな分布によって予測される結合したペプチドの中で有意により高い頻度で生じる。この二次アンカー残基は、「二次アンカー位置」にて生じるといわれる。二次アンカー残基は、高い親和性結合ペプチドまたは中程度の親和性結合ペプチドの中で高い頻度で存在する残基と同定され得るか、あるいは高い親和性結合または中程度の親和性結合で会合する他の残基と同定され得る。例えば、アナログペプチドは、これらの二次アンカー位置における特定の残基の存在または非存在を変更することによって作製され得る。そのようなアナログは、特定のモチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドの結合親和性を精密に調節するために使用される。

【0052】

「重優性エピトープ」は、エピトープを含むが、単離されたペプチドで免疫することによって応答が得られ得る完全な抗原で免疫した際に、ほとんどまたは全く応答を引き起こさないエピトープである。そしてこの応答（潜在エピトープの場合とは異なる）は、完全なタンパク質を用いて、インビトロまたはインビボでの応答を呼び戻す場合に検出される。

【0053】

「スーパーモチーフ」は、2つ以上のHLA対立遺伝子によりコードされるHLA分子により共有されるペプチド結合特異性である。好ましくは、スーパーモチーフを有するペプチドは、2つ以上のHLA抗原により（本明細書中で規定されるように）高親和性または中程度の親和性で認識される。

【0054】

「合成ペプチド」とは、化学合成または組換えDNA技術のような方法を用いた人工ペプチドをいう。

【0055】

本明細書中で用いられる場合、「ワクチン」は、1つ以上の本発明のペプチドを含む組成物である。本発明に従うワクチンの多くの実施形態が存在する（例えば、1つ以上のペプチドのカクテル；ポリエピトープペプチドにより構成された

本発明の1つ以上のエピトープ；あるいはこのようなペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸（例えば、ポリエピトープペプチドをコードするミニ遺伝子）によるもの。「1つ以上のペプチド」は、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100以上の本発明のペプチドを含み得る。このペプチドまたはポリペプチドは、必要に応じて、例えば、脂質化（lipidation）、標的化配列または他の配列の付加によって改変され得る。本発明のHLAクラスI結合ペプチドは、HLAクラスII結合ペプチドと混合されるか、または連結されて、細胞傷害性Tリンパ球およびヘルパーTリンパ球の両方の活性化を促進し得る。ワクチンはまた、ペプチドパルス化抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を含み得る。

【0056】

ペプチド化合物を記載するために用いた名称は、各アミノ酸残基のアミノ基が左（N末端）に、そしてカルボキシル基が右（C末端）に示される従来の慣行に従う。アミノ酸残基位置がペプチドエピトープにおいて言及される場合、それらは、アミノからカルボキシルの方向に番号付けされ、1位は、エピトープ、またはエピトープが一部分であり得るペプチドもしくはタンパク質のアミノ末端に最も近い位置である。本発明の選択された特定の実施形態を示す式において、アミノ末端基およびカルボキシル末端基（特に示されない）は、他に特定されなければ、それらが生理学的pH値において呈する形態にある。アミノ酸構造式において、各残基は、一般に標準的な3文字または1文字表記により示される。アミノ酸残基のL形態は、大文字の1文字記号または最初が大文字の3文字記号により示される。そしてD形態を有するこれらのアミノ酸のD形態は、小文字の1文字記号または小文字の3文字記号により示される。グリシンは、不斉炭素原子を有さず、そして単に「Gly」または「G」と示される。アミノ酸の記号を以下に示す。

【0057】

【表1】

1文字表記	3文字表記	アミノ酸
A	A l a	アラニン
C	C y s	システイン
D	A s p	アスパラギン酸
E	G l u	グルタミン酸
F	P h e	フェニルアラニン
G	G l y	グリシン
H	H i s	ヒスチジン
I	I l e	イソロイシン
K	L y s	リジン
L	L e u	ロイシン
M	M e t	メチオニン
N	A s n	アスパラギン
P	P r o	プロリン
Q	G l n	グルタミン
R	A r g	アルギニン
S	S e r	セリン
T	T h r	スレオニン
V	V a l	バリン
W	T r p	トリプトファン
Y	T y r	チロシン

(IV. B. CTL応答およびHTL応答の刺激)

T細胞が抗原を認識する機構は、過去十年の間に詳細に示されてきた。免疫系の本発明者らの理解に基づいて、本発明者らは、広範な集団においてHCVに対する治療的または予防的免疫応答を誘導し得る有効なペプチドエピトープワクチン組成物を開発した。本願組成物の価値および有効性の理解のために、免疫学関連技術の簡単な総説を提供する。

【0058】

HLA分子とペプチド抗原の複合体は、HLA拘束T細胞により認識されるリガンドとして働く(Buus, S. ら, Cell 47:1071, 1986;

Babbitt, B. P. ら, *Nature* 317:359, 1985; Townsend, A. および Bodmer, H., *Annu. Rev. Immunol.* 7:601, 1989; Germain, R. N., *Annu. Rev. Immunol.* 11:403, 1993)。1つのアミノ酸を置換した抗原アナログおよび内因的に結合した天然にプロセシングされたペプチドの配列決定の研究を通して、HLA抗原分子に対する特異的結合に必要なモチーフに対応する重要な残基が同定され、そして本明細書中に記載され、そして表I、IIおよびIIIに示される（例えば、Southwoodら, *J. Immunol.* 160:3363, 1998; Rammenseeら, *Immunogenetics* 41:178, 1995; Rammenseeら, SYFPEITHI (ウェブを介して以下にアクセスすること: <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>); Sette, A. および Sidney, J. *Curr. Opin. Immunol.* 10:478, 1998; Engelhard, V. H., *Curr. Opin. Immunol.* 6:13, 1994; Sette, A. および Grey, H. M., *Curr. Opin. Immunol.* 4:79, 1992; Sinigaglia, F. および Hammer, J. *Curr. Biol.* 6:52, 1994; Ruppertら, *Cell* 74:929-937, 1993; Kondoら, *J. Immunol.* 155:4307-4312, 1995; Sidneyら, *J. Immunol.* 157:3480-3490, 1996; Sidneyら, *Human Immunol.* 45:79-93, 1996; Sette, A. および Sidney, J. *Immunogenetics* (印刷中), 1999もまた参照のこと)。

【0059】

さらに、HLA-ペプチド複合体のX線結晶解析により、対立遺伝子特異的様式でペプチドリガンドが保有する残基と適応するHLA分子のペプチド結合溝 (peptide binding cleft) 内のポケットが明らかになった；これらの残基は、次に、これらの残基が存在するペプチドのHLA結合能力を決定する（例えば、Madden, D. R. *Annu. Rev. Immunol.*

. 13:587, 1995; Smithら, Immunity 4:203, 1996; Fremontら, Immunity 8:305, 1998; Sternら, Structure 2:245, 1994; Jones, E. Y. Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997; Brown, J. H. ら, Nature 364:33, 1993; Guo, H. C. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8053, 1993; Guo, H. C. ら, Nature 360:364, 1992; Silver, M. L. ら, Nature 360:367, 1992; Matsumura, M. ら, Science 257:927, 1992; Maddenら, Cell 70:1035, 1992; Fremont, D. H. ら, Science 257:919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. およびWiley, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991を参照のこと)。

【0060】

従って、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子特異的HLA結合モチーフ、またはクラスIもしくはクラスIIのスーパーモチーフの規定は、特定のHLA抗原を結合する能力を有するタンパク質内の領域の同定を可能にする。

【0061】

本発明者らは、結合親性と免疫原性との相関（本明細書中に開示される）が、候補ペプチドを評価する場合に考慮されるべき重要な因子であることを見出した。従って、モチーフ検索とHLA-ペプチド結合アッセイとの組み合わせにより、エピトープベースのワクチンの候補が同定された。それらの結合親性を決定した後、さらなる確認作業を行って、これらのワクチン候補の中で、集団適用範囲、抗原性および免疫原性の点で好ましい特徴を有するエピトープを選択し得る。

【0062】

種々のストラテジーを利用して、免疫原性を評価し得る。これらのストラテジーとしては、以下が挙げられる：

- 1) 正常個体由来の初代T細胞培養物の評価（例えば、Wentworth,

P. A. ら, *Mol. Immunol.* 32:603, 1995; Celis, E. ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2105, 1994; Tsai, V. ら, *J. Immunol.* 158:1796, 1997; Kawashima, I. ら, *Human Immunol.* 59:1, 1998); この手順は、正常被験体由来の末梢血リンパ球 (PBL) を、インビトロで抗原提示細胞の存在下で数週間にわたり試験ペプチドで刺激することを包含する。このペプチドに特異的なT細胞は、この期間に活性化され、そして例えば、ペプチド感作標的細胞に伴う ^{51}Cr 放出アッセイを用いて検出される。

【0063】

2) HLAトランスジェニックマウスの免疫 (例えば, Wentworth, P. A. ら, *J. Immunol.* 26:97, 1996; Wentworth, P. A. ら, *Int. Immunol.* 8:651, 1996; Alexander, J. ら, *J. Immunol.* 159:4753, 1997); この方法において、不完全フロイントアジュバント中のペプチドをHLAトランスジェニックマウスの皮下に投与する。免疫して数週間後に、脾細胞を取り出し、そしてインビトロで約1週間にわたり試験ペプチドの存在下で培養する。ペプチド特異的T細胞は、例えば、ペプチド感作標的細胞および内因的に生成した抗原を発現する標的細胞に伴う ^{51}Cr 放出アッセイを用いて検出される。

【0064】

3) 有効にワクチン接種された個体、感染から回復した個体、および／または慢性的に感染した患者の免疫からT細胞応答を呼び戻すという実証 (例えば, Rehmann, B. ら, *J. Exp. Med.* 181:1047, 1995; Doolan, D. L. ら, *Immunity* 7:97, 1997; Bertoni, R. ら, *J. Clin. Invest.* 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. ら, *J. Immunol.* 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. ら, *J. Virol.* 71:6011, 1997を参照のこと)。このストラテジーを適用する際に、応答を呼び戻すことは、例えば、感染を通じて天然に抗原に曝された (従って、「天然に」免疫応答を生成した) 被験体由来のPBLまたは感染に対してワクチン接種された患者

由来のPBLを培養することによって検出される。被験体由来のPBLを、インビトロで試験ペプチドおよび抗原提示細胞（APC）の存在下で1～2週間の間培養して、「ネイティブな」T細胞と比較して、「記憶」T細胞の活性化を可能にする。培養期間の終わりに、T細胞活性を、ペプチド感作された標的、T細胞増殖、またはリンホカイン放出を伴う⁵¹Cr放出を含むT細胞活性についてのアッセイを用いて検出する。

【0065】

以下は、本発明のペプチドエпитープおよび対応する核酸を記載する。

【0066】

（IV. C. HLA分子に対するペプチドエпитープの結合親和性）

高度なHLA多型は、ワクチン開発へのエпитープベースのアプローチと共に考察するために重要な因子である。この因子に取り組むために、高いかまたは中間の親和性で複数のHLA分子に結合し得るペプチドを同定する工程を包含するエпитープの選択がしばしば使用され、最も好ましくは、これらのエпитープは、高いかまたは中間の親和性で2つ以上の対立遺伝子特異的HLA分子に結合する。

【0067】

ワクチン組成物のための目的のCTL誘導ペプチドとしては、好ましくは、500 nMまたは500 μ Mより優れたクラスI HLA分子に対するIC₅₀または結合親和性の値（すなわち、この値は500 nM以下である）を有するペプチドが挙げられる。HTL誘導ペプチドとしては、好ましくは、1000 nMまたは1000 nMより優れたクラスII HLA分子に対するIC₅₀または結合親和性の値（すなわち、この値は1,000 nM以下である）を有するペプチドが挙げられる。例えば、ペプチド結合は、インビトロにおいて候補ペプチドが精製HLA分子に結合する能力を試験することによって評価される。次いで、高いかまたは中間の親和性を示すペプチドは、さらなる分析のために考察される。選択されたペプチドは、スーパータイプファミリーの他のメンバーについて試験される。好ましい実施形態において、交差反応結合を阻害するペプチドは、次いで、ワクチンまたは細胞スクリーニング分析において使用される。

【0068】

より高いHLA結合親和性は、典型的に、より大きな免疫原性と相関している。より大きな免疫原性は、いくつかの異なる様式において明確であり得る。免疫原性は、免疫応答が本当に誘発される否か、および任意の特定の応答の効力、ならびに応答が誘発される集団の程度に対応する。例えば、ペプチドは、強力な応答を生成する場合を除いて、集団の多様なアレイにおける免疫応答を引き起こし得る。これらの原理に従って、90%近い高結合ペプチドは、中間の親和性で結合するペプチドの約50%と対照してみると、免疫原性であることが見出されている。さらに、高結合親和性ペプチドは、より強力な免疫原性応答を引き起こす。結果として、高親和性結合ペプチドが使用される場合、ペプチドは同様の生物学的効果を引き起こす必要はあまりない。従って、本発明の好ましい実施形態において、高親和性結合エピトープは特に有用である。

【0069】

HLAクラスI分子に対する結合親和性と結合抗原上の別個のペプチドエピトープの免疫原性との間の関係は、本発明者によって当該分野で初めて決定された。結合親和性と免疫原性との間の相関は、2つの異なる実験的なアプローチで分析された（例えば、Setteら、J. Immunol. 153:5586-5592, 1994を参照のこと）。第1のアプローチにおいて、10,000倍の範囲を超えるHLA結合親和性の範囲の潜在的エピトープの免疫原性が、HLA-A*0201トランスジェニックマウスにおいて分析された。第2のアプローチにおいて、約100個の異なるB型肝炎ウイルス（HBV）由来潜在のエピトープ（全てが、A*0201結合モチーフを保有する）の抗原性は、急性肝炎の患者由来のPBLを使用することによって評価された。これらのアプローチに従って、約500nM（好ましくは、50nM以下）の親和性閾値はペプチドエピトープがCTL応答を引き起こす能力を決定することが決定された。これらのデータは、天然でプロセシングされたペプチドおよび合成T細胞エピトープに対するクラスI結合親和性の測定について当てはまる。これらのデータはまた、T細胞応答の具体化（shaping）における決定因子の選択の重要な役割を示す（例えば、Schaefferら、Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 86:4649-4653, 1989を参照のこと)。

【0070】

HLAクラスII DR分子の状況における免疫原性に関連する親和性閾値がまた示されている(例えば、Southwoodら、J. Immunology 160:3363-3373, 1998を参照のこと)。DR結合親和性の生物学的に有意な閾値を規定するために、32個のDR拘束エピトープのそれらの拘束エレメント(すなわち、モチーフに結合するHLA分子)に対する結合親和性のデータベースが集計された。これらの場合の約半分(32個のエピトープのうち15個)において、DR拘束は高結合親和性(すなわち、100 nM以下の結合親和性値)に関連していた。これらの場合の残りの半分(32個のうちの16個)において、DR拘束は中間の親和性(100~1000 nM範囲の結合親和性値)に関連していた。32個の場合のうちただ1つにおいて、DR制限は1000 nM以上のIC₅₀に関連していた。従って、1000 nMは、DR分子の状況における免疫原性に関連する親和性閾値として定義され得る。

【0071】

HLA分子に対するペプチドの結合親和性は、以下の実施例1のように決定され得る。

【0072】

(IV. D. ペプチドエピトープ結合モチーフおよびスーパーモチーフ)

この数年間で、大部分のHLAクラスIおよびクラスII分子が比較的少量のスーパータイプ(これらの各々は、ペプチド結合範囲と主なペプチド結合ポケットのコンセンサス構造とを大部分重ねることによって特徴付けられる)に分類され得ることを示す証拠が蓄積されている。

【0073】

HLA分子ポケット分析について、結晶学的研究において記載されるようなHLAクラスI分子のBおよびFポケットを含む残基が分析された(例えば、Guo, H. C. ら、Nature 360:364, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. およびWiley, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991; Maddern, D. R., Garbo

czi, D. N. およびWiley, D. C., Cell 75:693, 1993; Parham, P., Adams, E. J., およびArnett, K. L., Immunol. Rev. 143:141, 1995を参照のこと)。これらの分析において、残基9、45、63、66、67、70および99は、Bポケットを構成すると考えられ；そしてそのBポケットは、ペプチドリガンドの2位におけるアミノ酸残基に対する特異性を決定すると考えられた。同様に、残基77、80、81および116は、Fポケットの特異性を決定すると考えられ；このFポケットは、HLAクラスI分子により結合されたペプチドリガンドのC末端残基に対する特異性を決定するとみなされた。

【0074】

単一のアミノ酸置換抗原アナログの研究、および内因的に結合し、天然でプロセシングされたペプチドの配列決定によって、HLA分子への対立遺伝子特異的結合に必要な重要な残基が同定された。これらの残基の存在は、HLA分子に対する結合親和性と相関する。高いかまたは中間の親和性結合に相関するモチーフおよび／またはスーパーモチーフの同定は、ワクチンに含有させるための免疫原性ペプチドエピトープの同定に関する重要な問題である。Kastら(J. Immunol. 152:3904-3912, 1994)は、モチーフ保有ペプチドは、対立遺伝子特異的HLAクラスI分子に結合するエピトープの90%を構成することを示した。この研究において、9個のアミノ酸長かつ8個のアミノ酸が重なる全ての可能なペプチド(240個のペプチド)(これはヒト乳頭腫ウイルス属16型のE6およびE7タンパク質の配列全体をカバーする)は、異なる人種間で高頻度で発現される5個の対立遺伝子特異的HLA分子への結合について評価された。この偏りのないペプチドのセットは、HLAクラスIモチーフの予測値の評価を可能にした。240個のペプチドのセットから、高いかまたは中間の親和性を有する対立遺伝子特異的HLA分子に結合する22個のペプチドが同定された。これらの22個のペプチドのうち、20個(すなわち、91%)はモチーフを保有していた。従って、この研究は、ワクチンに含有させるためのペプチドエピトープの同定のためのモチーフの値を立証し；モチーフベースの同定技術の適用は、標的抗原タンパク質配列における潜在的エピトープの90%の

クリーニングを排除する。

【0075】

このようなペプチドエピトープは、以下に記載される表で同定される。

【0076】

本発明のペプチドはまた、MHCクラスII DR分子に結合するエピトープを含み得る。ペプチドのN末端およびC末端に対する、モチーフのサイズおよび結合フレームの位置の両方におけるより大きな程度の異質性は、クラスIIペプチドリガンドについて存在する。このHLAクラスIIペプチドリガンドの増加した異質性は、HLAクラスII分子の結合溝の構造に由来し、これはクラスIIの対応物と異なり、両端で開いている。HLAクラスII DRB*0101ペプチド複合体の結晶学的分析は、結合の主なエネルギーが、DRB*0101分子上の相補的ポケットと複合化したペプチド残基に寄与されることを示した。重要なアンカー残基は、最も深い疎水性ポケットに係合し（例えば、Madden, D. R. Ann. Rev. Immunol. 13:587, 1995を参照のこと）、そして1位（P1）と称される。P1は、クラスII結合ペプチドエピトープのN末端残基を表すが、より代表的には、1つ以上の残基によって、N末端に向かって隣接される。他の研究はまた、様々なDR分子に結合するため、P1に対してC末端に向かって6番目の位置のペプチド残基の重要な役割を指摘した。

【0077】

従って、本発明のペプチドは、いくつかのHLA特異的アミノ酸モチーフの任意の1つによって同定される（例えば、表IIIIを参照のこと）。モチーフの存在がいくつかの対立遺伝子特異的HLA抗原に結合する能力と対応する場合、これはスーパーモチーフと称される。特定のアミノ酸モチーフを有するペプチドに結合するHLA分子は、まとめてHLA「スーパーモチーフ」と称される。

【0078】

以下に記載され、表IIIIに要約されるペプチドモチーフおよびスーパーモチーフは、本発明に従うペプチドエピトープの同定および使用のためのガイドンスを提供する。

【0079】

それぞれのスーパーモチーフまたはモチーフを保有するペプチドエピトープの例は、以下の各モチーフまたはスーパーモチーフの説明において示されるような表に挙げられる。これらの表は、ペプチドエピトープのいくつかについての結合親和性比の表を含む。この比は以下の式を使用することによって、 IC_{50} に変換され得る： $標準ペプチドのIC_{50} / 比 = 試験ペプチド（すなわち、ペプチドエピトープ）のIC_{50}$ 。クラスIペプチドに対する結合親和性を決定するために使用される標準ペプチドの IC_{50} 値は、表IVに示される。クラスIIペプチドに対する結合親和性を決定するために使用される標準ペプチドの IC_{50} 値は、表Vに示される。本明細書中に記載される結合アッセイのための標準として使用されるペプチドは、標準の例であり；代替の標準ペプチドはまた、このような分析を実施する場合に使用され得る。

【0080】

各表に列挙されるペプチドエピトープ配列を得るために、14個のHCV単離体のタンパク質配列データは、指定されたスーパーモチーフまたはモチーフの存在について評価された。この14個の株は、HPCCGAA、HPCPLYPRE、HCV-H-CMR、HCV-J1、HPCGENANTI、HPCGENOM、HPCHUMR、HPCJCG、HPCJTA、HCV-J483、HCV-JK1、HCV-N、HPCPOLP、およびHCV-J8を含む。ペプチドエピトープは、さらに、これらの14個の株の中の保存性に基づいて評価された。保存性の基準は、HLAクラスI結合ペプチドの配列全体が、特定のタンパク質について利用可能な配列の79%において全体的に保存されていることを必要とする。同様に、保存性の基準は、HLAクラスII結合ペプチドの9マーのコア領域全体が、特定のタンパク質について利用可能な配列の79%において全体的に保存されていることを必要とする。選択されたペプチドエピトープの保存性%は、表に示される。頻度（すなわち、この14個の株のうち全体的に保存されるペプチド配列が同定された株の数）もまた示される。表中の「位置」のカラムは、エピトープの最初のアミノ酸残基に対応するHCVポリタンパク質のアミノ酸位置を示す。「アミノ酸の数」は、エピトープ配列中の残基の数を示す。

【0081】

(CTL誘導ペプチドエピトープを示すHLAクラスIモチーフ)

以下に示されるHLAクラスIペプチドエピトープスーパーモチーフおよびモチーフの一次アンカー残基を、表Iに要約する。表I(a)に記載されるHLAクラスIモチーフは、本明細書中で、本願発明に最もよく関連するものである。一次および二次アンカー位置は、表IIに要約される。HLAクラスIスーパータイプファミリーを含む対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに列挙される。

【0082】

(IV. D. 1. HLA-A1スーパーモチーフ)

HLA-A1スーパーモチーフは、エピトープの2位における小さな(TまたはS)または疎水性の(L、I、VまたはM)一次アンカー残基のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における芳香族の(Y、FまたはW)一次アンカー残基のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられる。A1スーパーモチーフ(すなわち、HLA-A1スーパータイプ)に結合するHLA分子の対応するファミリーは、少なくともA*0101、A*2601、A*2602、A*2501、およびA*3201を含む(例えば、DiBrino, M. ら、J. Immunol. 151:5930, 1993; DiBrino, M. ら、J. Immunol. 152:620, 1994; Kondo, A. ら、Immunogenetics 45:249, 1997を参照のこと)。A1スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。個々のHLAタンパク質の各々に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換によって、好ましくはスーパーモチーフに対して特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0083】

A1スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表VIIに記載される。

【0084】

(IV. D. 2. HLA-A2スーパーモチーフ)

対立遺伝子特異的HLA-A2.1分子に対する一次アンカーの特異性(Fa

Ikら、Nature 351:290-296, 1991; Huntら、Science 255:1261-1263, 1992; Parkerら、J. Immunol. 149:3580-3587, 1992)、およびHLA A2ファミリー内の交差反応結合 (Fruciら、Human Immunol. 38:187-192, 1993; Tanigakiら、Human Immunol. 39:155-162, 1994) が記載されている。本発明者らは、複数の対立遺伝子特異的HLA A2分子への交差反応結合を決定するさらなる一次アンカー残基を規定した (Ruppertら、Cell 74:929-937, 1993; Del Guercioら、J. Immunol. 154:685-693, 1995; Kastら、J. Immunol. 152:3904-3912, 1994)。HLA-A2スーパーモチーフは、エピトープの2位に一次アンカー残基としてL、I、V、M、A、TまたはQを、C末端位に一次アンカー残基としてL、I、V、M、AまたはTを有するペプチドリガンドを含む。

【0085】

HLA分子の対応するファミリー (すなわち、これらのペプチドに結合するHLA-A2スーパータイプ) は、少なくともA*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、A*0206、A*0207、A*0209、A*0214、A*6802、およびA*6901からなる。A2スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。以下に詳細に説明されるように、個々の対立遺伝子特異的HLA分子の各々への結合は、一次アンカーおよび/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、このスーパーモチーフに対して特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0086】

A2スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表VIIIIに記載される。2位において一次アンカー残基V、A、TまたはQを、そしてC末端位においてL、I、V、AまたはTを含むモチーフは、ここで本願発明に特に最も関連するものである。

【0087】

(IV. D. 3. HLA-A3スーパーモチーフ)

HLA-A3スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカーとして、A、L、I、V、M、SまたはTのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端（すなわち、9マアの9位）における一次アンカーとして、正電荷の残基RまたはKの存在によって特徴付けられる。A3スーパーモチーフに結合するHLA分子（HLA-A3スーパータイプ）の対応するファミリーの例示的なメンバーは、少なくともA*0301、A*1101、A*3101、A*3301およびA*6801を含む。A3スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。以下で詳細に説明されるように、個々の対立遺伝子特異的HLAタンパク質の各々に結合するペプチドは、ペプチドの一次および／または二次アンカー位置におけるアミノ酸の置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0088】

A3スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表IXに記載される。

【0089】

(IV. D. 4. HLA-A24スーパーモチーフ)

HLA-A24スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカーとして、芳香族（F、WまたはY）または疎水性脂肪族（L、I、V、MまたはT）残基のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカーとして、Y、F、W、L、IまたはMの存在によって特徴付けられる。A24スーパーモチーフ（すなわち、A24スーパータイプ）に結合するHLA分子の対応するファミリーは、少なくともA*2402、A*3001およびA*2301を含む。A24スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。対立遺伝子特異的HLA分子の各々に結合するペプチドは、一次および／または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0090】

A24スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表Xに記載される。

【0091】

(IV. D. 5. HLA-B7スーパーモチーフ)

HLA-B7スーパーモチーフは、一次アンカーとして、エピトープの2位におけるペプチド保有プロリンによって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカーとして、疎水性または脂肪族のアミノ酸(L、I、V、M、A、F、WまたはY)によって特徴付けられる。B7スーパーモチーフに結合するHLA分子(すなわち、HLA-B7スーパータイプ)の対応するファミリーは、B*0702、B*0703、B*0704、B*0705、B*1508、B*3501、B*3502、B*3503、B*3504、B*3505、B*3506、B*3507、B*3508、B*5101、B*5102、B*5103、B*5104、B*5105、B*5301、B*5401、B*5501、B*5502、B*5601、B*5602、B*6701、およびB*7801を含む少なくとも26個のHLA-Bタンパク質からなる(例えば、Sidneyら、J. Immunol. 154:247, 1995; Barberら、Curr. Biol. 5:179, 1995; Hillら、Nature 360:434, 1992; Rammenseeら、Immunogenetics 41:178, 1995を参照のこと)。B7スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。以下に詳細に説明されるように、個々の対立遺伝子特異的HLAタンパク質の各々に結合するペプチドは、ペプチドの一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0092】

B7スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表XIに記載される。

【0093】

(IV. D. 6. HLA-B27スーパーモチーフ)

HLA-B27スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカー

として、正電荷の残基（R、HまたはK）のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカーとして、疎水性の残基（F、Y、L、W、M、I、AまたはV）のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられる。B27スーパーモチーフ（すなわち、B27スーパータイプ）に結合するHLA分子の対応するファミリーの例示的なメンバーは、少なくともB*1401、B*1402、B*1509、B*2702、B*2703、B*2704、B*2705、B*2706、B*3801、B*3901、B*3902、およびB*7301を含む。B27スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。対立遺伝子特異的HLA分子の各々に結合するペプチドは、一次および／または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0094】

B27スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表XIIに記載される。

【0095】

(IV. D. 7. HLA-B44スーパーモチーフ)

HLA-B44スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカーとして、負電荷の残基（DまたはE）のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカーとして、疎水性残基（F、W、Y、L、I、M、VまたはA）の存在によって特徴付けられる。B44スーパーモチーフ（すなわち、B44スーパータイプ）に結合するHLA分子の対応するファミリーの例示的なメンバーは、少なくともB*1801、B*1802、B*3701、B*4001、B*4002、B*4006、B*4402、B*4403、およびB*4006を含む。対立遺伝子特異的HLA分子の各々に結合するペプチドは、一次および／または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0096】

(IV. D. 8. HLA-B58スーパーモチーフ)

HLA-B58スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカー残基として、小さな脂肪族残基(A、SまたはT)のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカー残基として、芳香族または疎水性残基(F、W、Y、L、I、V、MまたはA)の存在によって特徴付けられる。B58スーパーモチーフ(すなわち、B58スーパータイプ)に結合するHLA分子の対応するファミリーの例示的なメンバーは、少なくともB*1516、B*1517、B*5701、B*5702、およびB*5801を含む。B58スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。対立遺伝子特異的分子の各々に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0097】

B58スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表XIIIに記載される。

【0098】

(IV. D. 9. HLA-B62スーパーモチーフ)

HLA-B62スーパーモチーフは、エピトープの2位における一次アンカーとして、極性の脂肪族残基Qまたは疎水性の脂肪族残基(L、V、M、IまたはP)のペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカーとして、疎水性残基(F、W、Y、M、I、V、LまたはA)の存在によって特徴付けられる。B62スーパーモチーフ(すなわち、B62スーパータイプ)に結合するHLA分子の対応するファミリーの例示的なメンバーは、少なくともB*1501、B*1502、B*1513、およびB*5201を含む。B62スーパーファミリーのメンバーであることが予測される他の対立遺伝子特異的HLA分子は、表VIに示される。対立遺伝子特異的HLA分子の各々に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基

を選択することによって調節され得る。

【0099】

B62スーパーモチーフを含むペプチドエピトープは、表XIVに記載される。

【0100】

(IV. D. 10. HLA-A1モチーフ)

HLA-A1モチーフは、エピトープの2位における一次アンカー残基として、T、SまたはMのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカー残基として、Yの存在によって特徴付けられる。代替の対立遺伝子特異的A1モチーフは、2位よりむしろ3位における一次アンカー残基によって特徴付けられる。このモチーフは、エピトープの3位における一次アンカー残基として、D、E、AまたはSの存在によって特徴付けられ、そしてC末端位における一次アンカー残基として、Yの存在によって特徴付けられる。HLA-A1に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、このモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0101】

A1モチーフのいずれかを含むペプチドエピトープは、表XVに記載される。2位にT、SまたはMを、およびC末端位にYを含むエピトープはまた、表VIIに列挙されるHLA-A1スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープの表に含まれる。

【0102】

(IV. D. 11. HLA-A*0201モチーフ)

HLA-A2*0201モチーフは、9残基ペプチドの2位における一次アンカー残基として、LまたはMのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そして9残基ペプチドのC末端位における一次アンカー残基として、LまたはVの存在によって特徴付けられることが決定された (Falkら, Nature 351:290-296, 1991)。A*0201モチーフは、9アミノ酸ペプチドの2位においてIを、C末端においてIまたはAをさらに含むこと

が決定された (Huntら、Science 255:1261-1263, March 6, 1992; Parkerら、J. Immunol. 149:3580-3587, 1992)。続いて、A*0201対立遺伝子特異的モチーフは、本発明者らによって、V、A、TまたはQを、エピトープの2位における一次アンカー残基としてさらに含むことが規定され、そしてMを、C末端位における一次アンカー残基として含むことが規定されている。さらに、A*0201対立遺伝子特異的モチーフは、C末端位に、Tを含むことが見出された (Kastら、J. Immunol. 152:3904-3912, 1994)。従って、HLA-A*0201モチーフは、L、I、V、M、A、TまたはQを有するペプチドリガンドを、エピトープの2位における一次アンカー残基として含み、そしてL、I、V、M、AまたはTを、エピトープのC末端位における一次アンカー残基として含む。HLA-A*0201モチーフの一次アンカー位置を特徴付ける好ましくかつ寛容される残基は、A2スーパーモチーフを示す残基と同一である (関連のデータの総説については、例えば、Del Guercioら、J. Immunol. 154:685-693, 1995; Ruppertら、Cell 74:929-937, 1993; Sidneyら、Immunol. Today 17:261-266, 1996; SetteおよびSidney, Curr. Opin. in Immunol. 10:478-482, 1998を参照のこと)。A*0201モチーフを特徴付ける二次アンカー残基は、本明細書中で開示されるように、さらに定義されている。これらは、表IIに開示される。HLA-A*0201分子に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくは、このモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0103】

A*0201を含むペプチドエピトープは、表VIIIに記載される。一次アンカー残基V、A、TまたはQを、2位に含み、L、I、V、AまたはTを、C末端位に含むA*0201モチーフは、本明細書中で、本願発明に特に最も関連するものである。

【0104】

(IV, D, 12, HLA-A3モチーフ)

HLA-A3モチーフは、エピトープの2位における一次アンカー残基として、L、M、V、I、S、A、T、F、C、GまたはDのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカー残基として、K、Y、R、H、FまたはAの存在によって特徴付けられる。HLA-A3に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくはこのモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0105】

A3スーパーモチーフの一次アンカー残基は、A3-およびA11-対立遺伝子特異的モチーフの一次アンカー残基のサブセットを含む。A3モチーフを含むペプチドエピトープは、表XVIに記載される。A3スーパーモチーフを含むペプチドエピトープはまた、表IXに列挙される。

【0106】

(IV, D, 13, HLA-A11モチーフ)

HLA-A11モチーフは、エピトープの2位における一次アンカー残基として、V、T、M、L、I、S、A、G、N、C、DまたはFのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられ、そしてエピトープのC末端位における一次アンカー残基として、K、R、YまたはHの存在によって特徴付けられる。HLA-A11に結合するペプチドは、一次および/または二次アンカー位置における置換、好ましくはこのモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって、調節され得る。

【0107】

A11モチーフを含むペプチドエピトープは、表XVIIに記載され、A3対立遺伝子特異的モチーフを含むペプチドエピトープもまた、A3モチーフの一次アンカー特異性とA11モチーフの一次アンカー特異性との間の重なりのため、この表に示される。さらに、A3スーパーモチーフを含むペプチドエピトープもまた、表IXに列挙される。

【0108】

(IV. D. 14. HLA-A24モチーフ)

HLA-A24モチーフは、位置2における一次アンカー残基としてY、F、W、またはM、およびこのエピトープのC末端位置における一次アンカー残基としてF、L、I、またはWのペプチドリガンドにおける存在によって特徴付けられる。HLA-A24分子に結合するペプチドは、一次および/または二次のアンカー位置における置換；好ましくは、このモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0109】

A24モチーフを含むペプチドエピトープは、表XVIIIに示される。これらのエピトープはまた、表Xにおいて列挙され、これは、A24対立遺伝子特異的モチーフを特徴付ける一次アンカー残基が、A24スーパーモチーフ一次アンカー残基のサブセットを含むので、HLA-A24スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープを示す。

【0110】

(HLAクラスII結合モチーフ)

以下に描写したHLAクラスIIペプチドエピトープスーパーモチーフならびにモチーフの一次および二次のアンカー残基は、表IIIに要約される。

【0111】

(IV. D. 15. HLA-DR-1-4-7スーパーモチーフ)

モチーフはまた、3つの共通のHLAクラスII対立遺伝子特異的HLA分子(HLA DRB1*0401、HLA DRB1*0101、およびHLA DRB1*0701)に結合するペプチドについて同定された。集合的に、これらのモチーフ由来の共通の残基は、HLA DR-1-4-7スーパーモチーフを描写する。これらのDR分子に結合するペプチドは、位置1における一次アンカー残基として大きな芳香族残基または疎水性残基(Y、F、W、L、I、V、またはM)、および9マーマーのコア領域の位置6における一次アンカー残基として小さな非電荷残基(S、T、C、A、P、V、I、L、またはM)によって特徴付けられるスーパーモチーフを保有する。これらのHLA型の各々についての対立遺伝子特異的二次エフェクター(e f f e c t)および二次アンカーはまた、同

定されている。これらは、表I I Iにおいて示される。HLA DRB1*0401、HLA DRB1*0101、および/またはHLA DRB1*0701に結合するペプチドは、一次および/または二次のアンカー位置における置換、好ましくは、スーパーモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0112】

本分析のために使用されたHCV株の保存されたペプチドエピトープ（すなわち、79%以上（11/14以上）で保存されている）は、DR-1-4-7スーパーモチーフを含む9残基のコア（9残基のコアが79%以上で保存されている）を含むエピトープに対応するように記載され得る（ここで、このモチーフの位置1は、9残基のコアの位置1にある）。保存された9マーのコア領域は、表X I X aにおいて示される。15アミノ酸残基長のそれぞれの例示的なペプチドエピトープ（その各々は、保存された9残基のコアを含む）はまた、表の「a」節において示される。例示的な15残基のスーパーモチーフ保有ペプチドについての交差反応結合データは、表X I X bにおいて示される。

【0113】

(IV. D. 16. HLA-DR3モチーフ)

2つの代替的なモチーフ（すなわち、スーパーモチーフ）は、HLA-DR3分子に結合するペプチドエピトープを特徴付ける。第1のモチーフ（サブモチーフDR3A）において、大きな疎水性残基（L、I、V、M、F、またはY）は、9マーコアのアンカー位置1において存在し、そしてDは、このエピトープのカルボキシル末端に向かって位置4においてアンカーとして存在する。他のクラスIIモチーフなどの場合、コア位置1は、ペプチドN末端位置を占有してもよいし、占有しなくてもよい。

【0114】

代替のDR3サブモチーフは、このエピトープのカルボキシル末端に向かう位置6における正電荷の存在によって、アンカー位置1における大きな疎水性残基の欠失、および/または位置4における負に荷電したアンカー残基か、もしくはアミド様アンカー残基の欠失を規定する。従って、代替の対立遺伝子特異的DR

3モチーフ（スーパーモチーフDR3B）について、L、I、V、M、F、Y、A、またはYは、アンカー位置1において存在する；D、N、Q、E、S、またはTは、アンカー位置4において存在する；そしてK、R、またはHは、アンカー位置6において存在する。HLA-DR3に結合するペプチドは、一次および／または二次のアンカー位置における置換、好ましくは、このモチーフに特異化されたそれぞれの残基を選択することによって調節され得る。

【0115】

DR3Aスーパーモチーフを含む9残基の配列（ここで、このモチーフの位置1は、9残基のコアの位置1にある）に対応する保存された9マーカーのコア領域（すなわち、この分析のために使用された14HCV株の少なくとも79%保存されている配列）は、表XXaにおいて示される。15アミノ酸残基長のそれぞれの例示的なペプチドエピトープ（その各々は、保存された9残基のコアを含む）はまた、表XXaにおいて示される。表XXbは、例示的なDR3サブモチーフA保有ペプチドの結合データを示す。

【0116】

DR3Bサブモチーフを含む保存された9マーカーのコア領域（すなわち、この分析のために使用された14HCV株の少なくとも79%保存されている配列）およびDR3サブモチーフBエピトープを含むそれぞれの例示的な15マーカーのペプチドは、表XXcにおいて示される。表XXdは、例示的なDR3サブモチーフB保有ペプチドの結合データを示す。

【0117】

本明細書中の表に示されているHLAクラスIまたはクラスIIのペプチドエピトープの各々は、本願の発明の局面であることが単独で判断される。さらに、各々のペプチドエピトープが、任意の他のペプチドエピトープと組み合わせて使用され得ることもまた、本願の発明の局面である。

【0118】

（IV. E. ワクチンの増大する集団適用範囲）

広範な集団適用範囲を有するワクチンが好ましい。なぜなら、このワクチンは、より商業的に実行可能であり、そして一般的に、ほとんどの人々に適用可能で

あるからである。広範な集団適用範囲は、全てが考慮される場合、この集団のほとんどに存在するHLA対立遺伝子に結合するペプチドエピートープを選択することを通じて、本発明のペプチド（およびこのようなペプチドをコードする核酸組成物）を用いて得られ得る。表XXIは、種々の民族性におけるHLAクラスIスーパータイプの全体の頻度（表XXIa）、ならびにA2スーパータイプ、A3スーパータイプ、およびB7スーパータイプによって達成される組み合わせられた集団適用範囲（表XXIb）を列挙する。このA2スーパータイプ、A3スーパータイプ、およびB7スーパータイプは、5つの主な民族集団の各々において40%を超える平均値でそれぞれ存在する。80%より多い範囲は、これらのスーパーモチーフの組み合わせを用いて達成されることを示唆する。これらの結果は、効果的で、かつ非民族的に偏った集団適用範囲は、制限数の交差反応ペプチドの使用の際に達成される。これらの3つの主なペプチド特異性を用いて達した集団適用範囲は高いが、範囲は拡大され、95%およびそれを超える集団適用範囲に達し得、そしてさらなるスーパーモチーフ保有ペプチドまたは対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの使用の際の正確な多重特異性応答をより容易に達成する。

【0119】

B44スーパータイプ、A1スーパータイプ、およびA24スーパータイプは、これらの主な民族集団において平均25%～40%の範囲内で存在する（表XXIa）。全体としてあまり一般的ではないが、B27スーパータイプ、B58スーパータイプ、およびB62スーパータイプは、各々、少なくとも1つの主な民族集団において25%を超える頻度で存在する（表XXIa）。表XXIbは、5つの主な民族集団において同定されたHLAスーパータイプの組み合わせの評価された普及を要約する。A2範囲、A3範囲、およびB7範囲、または本明細書中に記載されるスーパータイプの全てへの、A1スーパータイプ、A24スーパータイプ、およびB44スーパータイプの包括によって得られる追加の範囲が示される。

【0120】

A2スーパータイプ、A3スーパータイプおよびB7スーパータイプの先の定

義とともに本明細書中に示されるデータは、A29、B8、およびB46の可能な除外とともに全ての抗原は、全部で9つのHLAスーパータイプに分類され得ることを示す。6つの最も頻度の高いスーパータイプ由来のエピトープを含むことによって、99%の平均集団適用範囲が、5つの主な民族集団について得られ得る。

【0121】

(IV. F. 免疫応答刺激ペプチドアナログ)

一般的には、CTLおよびHTL応答は、全ての可能なエピトープに対して指向されない。それどころか、それらは、少数の「免疫優性 (immunodominant)」決定基に制限される (Zinkernagelら、Adv. Immunol. 27:5159, 1979; Benninkら、J. Exp. Med. 168:1935-1939 (1988); Rawleら、J. Immunol. 146:3977-3984 (1991))。免疫優性 (Benacerafら、Science 175:273-279 (1972)) は、所定のエピトープの特定のHLAタンパク質を選択的に結合する能力 (決定基選択理論) (Vitielloら、J. Immunol. 131:1635 (1983); Rosenthalら、Nature 267:156-158 (1977)) または既存のTCR (T細胞レセプター) 特異性 (レパートリー理論) によって選択的に認識する能力 (Klein, J., IMMUNOLOGY, THE SCIENCE OF SELF/NONSELF DISCRIMINATION, John Wiley & Sons, New York, 270-310頁 (1982)) のいずれかによって説明され得る。主にプロセッシング事象と関連しているさらなる因子はまた、厳密な免疫原性を超えて決定することにおいて重要な役割を果たし得ることが証明された。多くの可能な決定基の厳密な免疫原性は、免疫優性として示される (Sercarzら、Annu. Rev. Immunol. 11:729-766 (1993))。

【0122】

優性および亜優性の概念は、感染症および癌の両方の免疫療法と関連する。例えば、慢性ウイルス疾患の経過において、亜優性エピトープの補充は、特に、優

性CTL特異性または優性HTL特異性が、ウイルス機構および他の機構の機能的寛容、抑制、変異によって不活化されている場合、感染の首尾よくクリアランスのために重要であり得る(Francoら、Curr. Opin. Immunol. 7:524-531(1995))。癌抗原および腫瘍抗原の場合、最も高い結合親和性ペプチドの少なくともいくつかを認識するCTLは、機能的に不活化され得る。このような場合、より低い結合親和性ペプチドは、優先的に認識され、従って、治療的または予防的な抗癌ワクチンにおいて好ましい。

【0123】

特に、公知の非ウイルス腫瘍関連抗原(TAA)由来の十分な数のエпитープが、HLAクラスIに中間の親和性(50~500nMの範囲のIC₅₀)で結合することが注目されている。例えば、15個の公知のTAAペプチドのうち8個が、50~500nM範囲で結合される腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)またはCTLによって認識したことが見出されている。これらのデータは、公知のウイルス抗原の90%が、50nM未満のIC₅₀でHLAクラスI分子によって結合されたが、50~500nM範囲においては、約10%のみが結合したという評価とは対称的である(Setteら、J. Immunol., 153:558-5592(1994))。癌の周辺環境において、この現象は、最も高い結合ペプチドのいくつかを認識するCTLの排除または機能的阻害に起因する。これは、おそらくT細胞寛容事象のためである。

【0124】

理論に拘束されることを意図しないで、優性エпитープに対するT細胞が、クロニ的に排除され得るので、重優性エпитープの選択は、既存のT細胞を補充することを可能にし得、次いで、これは、治療的または予防的応答を導くと考えられる。しかし、HLA分子の重優性エпитープへの結合は、しばしば、優性のエпитープに対してよりも活動的ではない。従って、1つ以上のHLA分子に対する特定の免疫原性エпитープの結合親和性を調節し得、それによって、ペプチドによって誘発される免疫応答を調節し、例えば、より活動的な応答を誘発するアナログペプチドを調製することが必要である。この能力は、ペプチドベースのワクチンおよび治療剤の有用性を非常に増強する。

【0125】

スーパーファミリーの全ての対立遺伝子間の適切な交差反応性を有するペプチドが上記のスクリーニング手順によって同定されるが、交差反応性は、必ず可能な限り常に完全とは限らず、そして、特定の場合において、ペプチドの交差反応性を増加させる手順は、有用であり得る；さらに、このような手順をまた使用して、このペプチドの他の特性（例えば、結合親和性またはペプチド安定性）を改変し得る。所定のモチーフまたはスーパーモチーフ内のHLA対立遺伝子についてのペプチドの交差反応性を支配する一般的な規定を確立したが、特定の目的のペプチドの構造の変更（すなわち、アナログ化）は、より広範な（もしくは、他の改変された）HLA結合能力を達成するために、実行され得る。より詳細には、最も広い交差反応パターンを示すペプチドが、本明細書中の教示に従って作製され得る。本概念は、アナログ作製に関して、1/6/99に出願された同時係属中のU. S. S. N. 09/226, 775においてより詳細に示される。

【0126】

簡潔には、使用したストラテジーは、特定のHLA分子への結合と関連するモチーフまたはスーパーモチーフを利用する。このモチーフまたはスーパーモチーフは、一次アンカーおよび多くの場合、二次アンカーを有することによって定義される。アナログペプチドは、一次アンカー、二次アンカーにおいて、または一次アンカー位置および二次アンカー位置においてアミノ酸残基を置換することによって作製され得る。一般的には、アナログは、すでにモチーフまたはスーパーモチーフを保有するペプチドについて作製される。HLAクラスIおよびHLAクラスII結合ペプチドについて規定されているスーパーモチーフおよびモチーフの好ましい二次アンカー残基は、表IIおよびIIIにそれぞれ示される。

【0127】

本発明に従って、多数のモチーフまたはスーパーモチーフについて、それぞれのモチーフまたはスーパーモチーフを結合するHLAスーパータイプの対立遺伝子特異的HLA分子またはメンバーに結合することが有害である残基が規定される（表IIおよびIII）。従って、結合が有害であるこのような残基の除去が、本発明に従って実行され得る。例えば、A3スーパータイプの場合、このよう

な有害な残基を有する全てのペプチドが、分析されたペプチドの集団から除去されると、交差反応性率が、22%から37%に上昇する（例えば、Sidney, J. ら、Hu. Immunol. 45:79, 1996を参照のこと）。従って、所定のスーパーモチーフ内のペプチドの交差反応性を改善する1つのストラテジーは、単に、ペプチド内に存在する1つ以上の有害な除去し、そして（ペプチドのT細胞認識に影響を与えない）小さな「中性」残基（例えば、Ala）を置換することである。ペプチド内の有害な残基の除去とともに、スーパーファミリー内の、対立遺伝子特異的HLA分子に、または複数のHLA分子への高い親和性での結合に関連する「好ましい」残基が挿入される場合、交差反応性の増強の可能性が予期される。

【0128】

ワクチンとして使用される場合、アナログペプチドが、インビボでネイティブエピトープに対するCTL応答を実際に誘発する（またはクラスIIエピトープの場合、野生型ペプチドと交差反応するヘルパーT細胞を誘発する）ことを確実にするために、このアナログペプチドは、適切なHLA対立遺伝子の個体からインビトロでT細胞を免疫するために使用され得る。その後、免疫された細胞の、野生型ペプチドに感作した標的細胞の溶解を誘導する能力が評価される。これは、内因的に産生された抗原がまた、関連のT細胞によって認識されるか否かを確立するために、抗原提示細胞として、適切な遺伝子を用いて感染またはトランスフェクトのいずれかをされた細胞、あるいはクラスIIエピトープのみの場合は、タンパク質抗原全体を用いてパルスされた細胞を使用することが望ましい。

【0129】

本発明の別の実施形態は、弱く結合するアナログを作製し、それによって、適当な数の交差反応細胞結合因子を確実にすることである。500~5000nMの結合親和性を示し、1つまたは両方の位置において適用可能であるが、最適下限の一次アンカーを有するクラスI結合ペプチドは、それぞれのスーパータイプに従って、好ましいアンカー残基を置換することによって「固定」され得る。次いで、このアナログペプチドは、交差結合活性について試験され得る。

【0130】

効果的なペプチドアナログを作製するための別の実施形態は、ペプチド安定性または可溶性（例えば、液体環境下で）に対する不都合な影響を有する残基の置換を含む。この置換は、ペプチドエピトープのいずれかの位置で生じ得る。例えば、システイン（C）は、 α アミノ酪酸で優先して置換され得る。この化学的性質のために、システインは、ジスルフィド結合を形成する性向を有し、そしてペプチドを構造的に十分に改変し、結合能力を減少する。Cの α アミノ酪酸での置換は、この問題を多少とも解決するだけでなく、特定の例（例えば、Setteらによる概説、Persistent Viral Infections, R. AhmedおよびI. Chen編、John Wiley & Sons, 英国（1999）を参照のこと）において結合能力および交差結合能力を実際に改善する。システインの α アミノ酪酸での置換は、ペプチドエピトープのいずれかの残基（すなわち、アンカー位置または非アンカー位置のいずれかにおいて）において生じ得る。

【0131】

代表的なアナログペプチドは、表XXIIに示される。表は、適切である場合、アナログペプチドおよびモチーフまたはスーパーモチーフの長さもしくは配列を示す。「固定された命名」の列にある情報は、それぞれのアナログについての示された位置番号において置換された残基を示す。

【0132】

（IV. G. スーパーモチーフまたはモチーフを含有するペプチドについての、疾患関連抗原由来タンパク質配列のコンピュータースクリーニング）

標的抗原におけるスーパーモチーフ保有エピトープまたはモチーフ保有エピトープを同定するために、ネイティブなタンパク質配列（例えば、腫瘍関連抗原）、または感染生物由来の配列、または移植のためのドナー組織由来の配列を、例えば、理論的予測（intellectual calculation）を計算するための手段またはコンピューターを使用してスクリーニングして、配列内のスーパーモチーフまたはモチーフの存在を決定する。ネイティブなペプチドの分析から得られた情報が、ネイティブなペプチドの状態を評価するために直接使用され得るか、またはペプチドエピトープを生成するために引き続き利用され

得る。

【0133】

本願のスーパーモチーフまたはモチーフの発現のためのタンパク質配列を迅速にスクリーニングすることを可能にするコンピュータプログラムは、本発明により包含され、アナログペプチドの生成を可能にするプログラムも同様に含まれる。これらのプログラムは、任意の同定されたアミノ酸配列を分析するかまたは、未知の配列に関して操作し、そして同時に配列を決定し、そしてそのモチーフ保有エピトープを同定することが実行され；アナログが、その上、同時に決定され得る。一般的に、同定された配列は、病原性生物または腫瘍関連ペプチド由来である。例えば、本明細書中で考えられる標的分子としては、限定されず、HCVの、コア領域、S領域、E1領域、NS1/E2領域、NS2領域、NS3領域、NS4領域、およびNS5領域が挙げられる。

【0134】

同じ標的タンパク質の複数の改変体の配列が可能である場合、ペプチドはまた、それらの保存に基づいて選択され得る。保存について現在好ましい基準は、HLAクラスI結合ペプチドの配列全体またはクラスII結合ペプチドの9マーコア全体が、特定のタンパク質に関して、評価される配列の少なくとも79%において完全に（すなわち、100%）保存されることを規定する。保存のこの規定は、本明細書中で使用されている；けれど、当業者に理解されるように、保存のより高いかまたはより低い程度は、所定の抗原標的に対して適切であるように使用され得る。

【0135】

ペプチド結合の予測のために利用される選択基準は、実際の結合と最も効率的に対応するために、可能な限り正確であることが重要である。適切な一次アンカーの存在に基づいて、例えば、HLA-A*0201に結合するペプチドの予測は、約30%の割合でポジティブである（例えば、Ruppert, J. ら、Cell 74:929, 1993）。しかし、本明細書中に開示されるペプチド-HLA結合データ、関連特許出願におけるデータ、および当該分野におけるデータを徹底的に分析することにより、本発明者らは、一次アンカー残基単独の存

在に基づく同定に対して、予測値を劇的に増大する多数の対立遺伝子特異的多項式アルゴリズムを開発した。これらのアルゴリズムは、一次アンカーの存在または非存在を考慮するだけでなく、（異なる位置における異なるアミノ酸の影響を説明するために）二次アンカー残基の、ポジティブな（positive）存在または有害な（deleterious）存在も考慮に入れる。このアルゴリズムは、本質的に、ペプチドHLA相互作用の全体の親和性（または ΔG ）がこの型の一次多項式関数として近似され得るという前提に基づき：

$$\Delta G = a_{1i} \times a_{2i} \times a_{3i} \cdots \times a_{ni}$$

ここで、 a_{ji} は、 n 個のアミノ酸のペプチドの配列に沿った、所定の位置（ i ）における所定のアミノ酸（ j ）の存在の効果を示す係数である。この方法の重要な仮定は、各位置における効果が、本質的に、その他の位置の効果と独立していることである。この仮定は、このペプチドがHLA分子に結合され、かつ本質的に延長された構造においてT細胞により認識されることを示す研究により立証される。特定のアルゴリズム係数の誘導が、例えば、Gulukota, K. ら、J. Mol. Biol. 267:1258, 1997に記載されている。

【0136】

特定のモチーフをまた利用する、好ましいペプチド配列を同定するためのさらなる方法は、神経網の使用および分子モデルプログラムの使用を含む（例えば、Milikら、Nature Biotechnology 16:753, 1998; Altuviaら、Hum. Immunol. 58:1, 1997; Altuviaら、J. Mol. Biol. 249:244, 1995; Buus, S. Curr. Opin. Immunol. 11:209-213, 1999; Brusie, V. ら、Bioinformatics 14:121-130, 1998; Parkerら、J. Immunol. 152:163, 1993; Meisterら、Vaccine 13:581, 1995; Hammerら、J. Exp. Med. 180:2353, 1994; Sturnioloら、Nature Biotechnol. 17:555 1999を参照のこと）。

【0137】

例えば、少なくとも1つの好ましい二次アンカー残基を含むA^{*}0201モチーフ保有ペプチドのセットにおいて、任意の有害な二次アンカー残基の存在を回避しながら、ペプチドの69%が、500nM未満のIC₅₀を有するA^{*}0201を結合することが示されている(Ruppert, J. ら, Cell 74: 929, 1993)。これらのアルゴリズムはまた、カットオスコアが、所望のように、より大きいかまたはより低い予測結合特性を有するペプチドのセットを選択するために調節され得る点で、柔軟である。

【0138】

ペプチドエпитープを同定するためのコンピュータースクリーニングを利用することにおいて、タンパク質配列または翻訳された配列が、モチーフを探索するために開発されたソフトウェア(例えば、[FINDPATTERNS] プログラム(Devereux ら, Nucl. Acids Res. 12:387-395, 1984) または Motif Search 1.4 ソフトウェアプログラム(D. Brown, San Diego, CA))を使用して分析され、適切なHLA結合モチーフを含む潜在的なペプチド配列を同定し得る。同定されたペプチドは、変更された多項式アルゴリズムを使用してスコアされ、特異的なHLAクラスI対立遺伝子またはクラスII対立遺伝子を結合するそれらペプチドの能力を予測し得る。当業者に理解されるように、コンピュータープログラミングソフトウェアおよびハードウェアオプションの大きなアレイが、(例えば、限定されず、エпитープを同定するか、1つのペプチド長あたりのエпитープ集中(concentration)を同定するか、またはアナログを生成するため) 公知または未知のペプチド配列を評価するため、本発明のモチーフを実行する(implement)ために使用され得る関連する技術が利用可能である。

【0139】

上記の手順に従って、HLAスーパータイプ群または対立遺伝子特異的HLA分子を結合し得るHCVペプチドエпитープおよびそのアナログが、同定された(表VII-XX; 表XXII)。

【0140】

(IV. H. ペプチドエпитープの調製)

本発明に従ったペプチドは、組換えDNA技術または化学合成により、あるいは天然の供給源（例えば、ネイティブな腫瘍または病原性生物）から合成的に調製され得る。ペプチドエピトープは、個々に合成され得るか、またはポリエピトープペプチドとして合成され得る。このペプチドは、好ましくは、実質的に他の天然に存在する宿主タンパク質およびそのタンパク質のフラグメントを含まないが、いくつかの実施形態において、このペプチドは、ネイティブなフラグメントまたは粒子に合成的に結合体化され得る。

【0141】

本発明に従ったペプチドは、種々の長さであり得、そして、それらの中和（荷電していない）形態または塩の形態のいずれかであり得る。本発明に従う、ペプチドは、改変（例えば、グリコシル化、側鎖の酸化、またはリン酸化）されていないか；またはこのペプチドがこれらの改変を含み、本明細書中に記載されるように、ペプチドの生物学的活性を破壊しない条件に供される。

【0142】

本発明のペプチドは、広範な種々の方法において調製され得る。好ましい、比較的短いサイズについて、このペプチドが、従来の技術に従って、溶液中または固体支持体上で合成され得る。種々の自動合成装置が市販され、そして公知のプロトコルに従って使用され得る（例えば、Stewart & Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2D. ED., Pierce Chemical Co., 1984を参照のこと）。さらに、個々のペプチドエピトープが、化学的連結を使用して結合され、本発明の範囲内になおある、より大きいペプチドを産生し得る。

【0143】

あるいは、組換えDNA技術が利用され得、ここで、目的の免疫原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現ベクター中に挿入されるか、適切な宿主細胞に、形質転換されるかまたはトランスフェクトされて、そして発現のための適切な条件下で培養される。これらの手順は、一般に当該分野で公知であり、Sambrookら、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press,

Cold Spring Harbor, New York (1989) に一般に記載される。従って、本発明の1つ以上のペプチド配列を含む組換えポリペプチドが、適切なT細胞エピトープを提示するために使用され得る。

【0144】

本明細書中で実行される好ましい長さのペプチドエピトープについての配列をコードするスクレオチドが、化学的技術（例えば、Matteucciら、J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981) のホスホトリエステル法）により合成され得る。ペプチドアナログは、ネイティブなペプチド配列をコードする塩基を適切かつ所望の核酸塩基に置換することにより、簡単に作製され得；例示的な核酸置換は、本明細書中のモチーフ／スーパーモチーフにより規定されるアミノ酸をコードする核酸置換である。次いで、このコード配列は、適切なリンカーを提供され得、そして当該分野で一般に利用可能な発現ベクター、および所望の融合タンパク質を産生するために適切な宿主を形質転換するために使用されるベクターに連結され得る。多数のこのようなベクターおよび適切な宿主系が、現在利用可能である。融合タンパク質の発現のために、コード配列は、作動可能に連結される開始コドンおよび停止コドン、プロモーター領域およびターミネーター領域ならびに所望の細胞性宿主における発現のための発現ベクターを提供する通常の複製系を提供される。例えば、細菌性宿主と互換性のあるプロモーター配列が、所望のコード配列の挿入のための都合の良い制限部位を含むプラスミドに提供される。得られた発現ベクターは、適切な細菌性宿主に形質転換される。もちろん、酵母細胞宿主、昆虫細胞宿主または哺乳動物細胞宿主もまた、適切なベクターおよびコントロール配列を使用して、使用され得る。

【0145】

ネイティブなタンパク質の免疫学的活性の全てをなお実質的に維持しながら、ペプチドエピトープは、可能な限り小さいことがしばしば好まれる。可能な場合、約8個～約13個のアミノ酸残基、好ましくは9個～10個のアミノ酸残基の長さに、本発明のHLAクラスI結合ペプチドエピトープを最適化することが所望され得る。HLAクラスII結合ペプチドエピトープは、約6～約30アミノ酸長の長さ、好ましくは約13個と約20個の残基との間に、最適化され得る。

好ましくは、ペプチドエピトープは、関連HLA分子に結合される、内因的にプロセスされた病原体由来ペプチドまたは腫瘍細胞ペプチドと、サイズにおいて等しいが、しかし、他の長さのペプチドの同定および調製もまた、本明細書中に記載される技術を使用して、実行され得る。

【0146】

代替の実施形態において、本発明のペプチドが、ポリエピトープペプチドとして、またはポリエピトープペプチドをコードするミニ遺伝子として連結され得る。

【0147】

別の実施形態において、高濃度のクラスIエピトープおよび/またはクラスIIエピトープを含むネイティブなペプチド領域を同定することが好まれる。このような配列は、一般に、この配列が1個のアミノ酸長あたりより多数のエピトープを含むことに基づいて、選択される。エピトープは、フレームシフトされた様式で存在し得ることが理解され、例えば、10個のアミノ酸長のペプチドは、2つの、アミノ酸長のエピトープおよび1つの、10アミノ酸長のエピトープを含み得；細胞内プロセッシングに際して、各エピトープが、このようなペプチドの投与の際に、HLA分子により曝露され得、かつ結合され得る。このより大きい、好ましくは複数のエピトープのペプチドが、合成的に、または組換え的に、またはネイティブな供給源からの切断を介して生成され得る。

【0148】

(IV. I. T細胞応答を検出するためのアッセイ)

一旦HLA結合ペプチドが同定されると、それらはT細胞応答を惹起する能力について試験され得る。モチーフ保有ペプチドの調製および評価は、PCT公開WO 94/20127およびWO 94/03205に記載される。簡潔に、特定の抗原由来のエピトープを含むペプチドが合成され、そして適切なHLAタンパク質に結合するそれらの能力について試験される。これらのアッセイは、放射ヨウ素標識された参照ペプチドの結合に関連して、精製されたHLAクラスI分子への本発明のペプチドの結合を評価する工程を包含する。あるいは、エンブティ（empty）クラスI分子（すなわち、そこにペプチドを欠く）を発現

する細胞は、免疫蛍光染色およびフロー微蛍光測定により、ペプチド結合について評価され得る。ペプチド結合を評価するために使用され得る他のアッセイとしては、ペプチド依存性クラスⅠアセンブリアッセイおよび／またはペプチド競合によるCTL認識の阻害が挙げられる。典型的に500 nMまたはそれより小さい親和性で、クラスⅠ分子に結合するこれらのペプチドは、さらに、感染した個体または免疫した個体由来のCTLに対する標的として機能するそれらの能力、および疾患に関連した選択された標的細胞と反応し得るCTL集団を生じる1次のインビトロまたはインビボCTL応答を誘導し得るそれらの能力について評価される。対応するアッセイは、HLAクラスⅠⅡ結合ペプチドの評価のために使用される。典型的に1000 nMまたはそれより低い親和性で結合することが示されるHLAクラスⅠⅡモチーフ保有ペプチドは、さらに、CTL応答を刺激する能力について評価される。

【0149】

T細胞応答を検出するために利用される従来のアッセイとしては、増幅アッセイ、リンホカイン分泌アッセイ、直接的細胞傷害性アッセイ、および限界希釈アッセイが挙げられる。例えば、ペプチドとともにインキュベートされる抗原提示細胞は、レスポンド（responder）細胞集団においてCTL応答を誘導する能力についてアッセイされ得る。抗原提示細胞は、通常の細胞（例えば、末梢血単核細胞または樹状細胞）であり得る。あるいは、内部的でプロセッシングされたペプチドでクラスⅠ分子を負荷（load）するそれらの能力を欠失し、そして適切なヒトクラスⅠ遺伝子でトランスフェクトされた変異体非ヒト哺乳動物細胞株が、インビトロ1次CTL応答を誘導するペプチドの能力を試験するために使用され得る。

【0150】

末梢血単核細胞（PBMC）は、CTL前駆体のレスポンド細胞供給源として使用され得る。適切な抗原提示細胞は、ペプチドとともにインキュベートされ、その後、ペプチド負荷された抗原提示細胞が、次いで、最適化された培養条件下でレスポンド細胞集団とインキュベートされる。陽性CTL活性は、放射線標識された標的細胞（特異的ペプチドバルス標的およびペプチド配列が由来する

抗原の内因的にプロセッシングされた形態を発現する標的細胞の両方)を殺傷するCTLの存在について培養物をアッセイすることによって決定され得る。

【0151】

より最近、フルオレセイン標識HLAテトラマー複合体を用いて染色することによって、抗原特異的T細胞の直接的な定量を可能にする方法が考え出されている(Altman, J. D. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330, 1993; Altman, J. D. ら, Science 274:94, 1996)。他の比較的最近の技術的な発達は、細胞内リンホカインに対する染色、およびインターフェロン放出アッセイまたはELISPOTアッセイを含む。テトラマー染色、細胞内リンホカイン染色およびELISPOTアッセイは、全て、より従来のアッセイより少なくとも10倍感度が高いようである(Lalvani, A. ら, J. Exp. Med. 186:859, 1997; Dunbar, P. R. ら, Curr. Biol. 8:413, 1998; Murali-Krishna, K. ら, Immunity 8:177, 1998)。

【0152】

HLT活性化もまた、T細胞増殖およびリンホカイン(例えば、IL-2)の分泌のような、当業者に公知のこのような技術を使用して評価され得る(例えば、Alexander ら, Immunity 1:751-761, 1994を参照のこと)。

【0153】

あるいは、HLAトランスジェニックマウスの免疫化が、ペプチドエピトープの免疫原性を決定するために使用され得る。ヒトA2、1対立遺伝子、ヒトA11対立遺伝子(これらは、HLA-A3エピトープを分析するためにさらに使用され得る)、およびヒトB7対立遺伝子を有するマウスを含むいくつかのトランスジェニックマウスモデルが特徴付けられ、そして他のもの(例えば、HLA-A1およびA24についてのトランスジェニックマウス)が開発されている。HLA-DR1およびHLA-DR3マウスモデルもまた、開発されている。他のHLA対立遺伝子を有するさらなるトランスジェニックマウスモデルが、必要な

らば作製され得る。マウスは、不完全フロイントアジュバント中に乳化されたペプチドで免疫化され得、そして生じたT細胞を、ペプチドパルスされた標的細胞および適切な遺伝子でトランスフェクトされた標的細胞を認識するそれらの能力について試験した。CTL応答が上記の細胞傷害性アッセイを使用して分析され得る。同様に、HTL応答が、T細胞増殖またはリンホカインの分泌のようなアッセイを使用して分析され得る。

【0154】

例示的な免疫原性ペプチドエピトープが、表XXIIIに記載される。

【0155】

(IV. J. 診断薬剤としての、および免疫応答を評価するためのペプチドエピトープの使用)

本発明の1つの実施形態において、本明細書中に記載されるHLAクラスIおよびクラスII結合ペプチドは、免疫応答を評価するための試薬として使用される。評価される免疫応答は、免疫源として任意の薬剤を使用することによって誘導され得、この任意の薬剤は、試薬として使用されるペプチドエピトープ(単数または複数)を認識しそしてそれに結合する、抗原特異的CTLまたはHTLを産生を生じ得る。このペプチド試薬は、免疫原として使用される必要がない。このような分析について使用され得るアッセイ系は、比較的最近の技術開発(例えば、テトラマー、細胞内リホカインについての染色およびインターフェロン放出アッセイ、またはELISPOTアッセイ)を含む。

【0156】

例えば、本発明のペプチドは、腫瘍細胞抗原または免疫原への暴露に続いて、抗原特異的CTLの存在について末梢血単核細胞を評価するためのテトラマー染色アッセイにおいて使用され得る。HLA-テトラマー複合体は、抗原特異的CTLを直接可視化するために使用され(例えば、Oggra, Science 279:2103-2106, 1998;およびAltmanら, Science 174:94-96, 1996)、そして末梢血単核細胞のサンプル中における抗原特異的CTL集団の頻度を決定する。本発明のペプチドを使用するテトラマー試薬は、以下のように生成され得る: HLA分子に結合するペプチドを対応

するHLA重鎖および β_2 -ミクログロブリンの存在下でリフォールディングして、3分子複合体を生成する。この複合体は、以前にタンパク質に操作された部位で重鎖のカルボキシル末端でデオチン化される。テトラマー形成が、次いで、ストレプトマイシンの添加によって誘導される。蛍光標識されたストレプトアビジンによって、このテトラマーは、抗原特異的細胞を染色するために使用され得る。これらの細胞が、次いで、例えば、フローサイトメトリーによって同定され得る。このような分析は、診断目的または予後目的のために使用され得る。この手順によって同定された細胞はまた、治療目的のために使用され得る。

【0157】

本発明のペプチドはまた、免疫リコール (recall) 応答を評価するための試薬として使用され得る。(例えば、Bertoniら, J. Clin. Invest. 100:503-513, 1997およびPennaら, J. Exp. Med. 174:1565-1570, 1991を参照のこと)。例えば、HCV感染した個体由来の患者PBMCサンプルは、特定のペプチドを使用して抗原特異的CTLまたはHTLの存在について分析され得る。単核細胞を含む血液サンプルが、PBMCを培養し、そして本発明のペプチドで細胞を刺激することによって評価され得る。適切な培養期間の後、拡大した細胞集団が、例えば、細胞傷害活性 (CTL) またはHTL活性について分析され得る。

【0158】

このペプチドはまた、ワクチンの効力を評価するための試薬として使用され得る。免疫原とともにワクチン接種された患者から得られたPBMCは、例えば、上記の方法のいずれかを使用して分析され得る。患者は、HLA型であり、そしてその患者に存在する対立遺伝子特異的分子を認識するペプチドエпитープ試薬が分析のために選択される。ワクチンの免疫原性は、PBMCサンプル中のエпитープ特異的CTLおよび/またはHTLの存在によって示される。

【0159】

本発明のペプチドはまた、当該分野で周知の技術を使用して、抗体を作製するために使用され得る (例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; およびAntibod

ies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照のこと)、これらは、癌を診断またはモニターするための試薬として有用であり得る。このような抗体は、HLA分子の文脈においてペプチドを認識する抗体（すなわち、ペプチド-MHC複合体に結合する抗体）を含む。

【0160】

(IV. K. ワクチン組成物)

ワクチンおよび本明細書中に記載されるような免疫原性的に有効量の1つまたは1より多いペプチドを含むワクチンを調製する方法は、本発明のさらなる実施形態である。一旦適切に免疫原性ペプチドが規定されると、それらは、種々の手段によって識別され、そして送達され得、本明細書中で、「ワクチン」組成物といわれる。このようなワクチン組成物としては、例えば、リボペプチド（例えば、Vitiello, A. ら, J. Clin. Invest. 95:341, 1995）、ポリ（DL-ラクチド-α-D-グリコリド）（「PLG」）マイクロスフィアにカプセル化されたペプチド組成物（例えば、Eldridge, ら, Molec. Immunol. 28:287-294, 1991; Alonso ら, Vaccine 12:299-306, 1994; Jones ら, Vaccine 13:675-681, 1995を参照のこと）、免疫刺激複合体（ISCOMS）に含まれるペプチド組成物（例えば、Takahashi ら, Nature 344:873-875, 1990; Hu ら, Clin Exp Immunol. 113:235-243, 1998を参照のこと）、多重抗原ペプチド系（MAP）（例えば、Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:5409-5413, 1988; Tam, J. P., J Immunol. Methods 196:17-32, 1996を参照のこと）、ウイルス送達ベクター（Perkus, M. E. ら, Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E., 編, 379頁, 1996; Chakrabarti, S. ら, Nature 320:535, 1986; Hu, S. L. ら, Nature

320:537, 1986; Kieny, M. - P. ら, *AIDS Biol/Technology* 4:790, 1986; Top, F. H. ら, *J. Infect. Dis.* 124:148, 1971; Chanda, P. K. ら, *Virology* 175:535, 1990)、ウイルスまたは合成起源の粒子(例えば、Kofler, N. ら, *J. Immunol. Methods.* 192:25, 1996; Eldridge, J. H. ら, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993; Fallo, L. D., Jr. ら, *Nature Med.* 7:649, 1995)、アジュバンド (Warren, H. S., Vogel, F. R., および Chedid, L. A. *Annu. Rev. Immunol.* 4:369, 1986; Gupta, R. K. ら, *Vaccine* 11:293, 1993)、リボソーム (Reddy, R. ら, *J. Immunol.* 148:1585, 1992; Rock, K. L., *Immunol. Today* 17:131, 1996)、あるいは、裸のcDNAまたは粒子吸収cDNA (Ulmer, J. B. ら, *Science* 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A., および Webster, R. G., *Vaccine* 11:957, 1993; Shiver, J. W. ら, *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., 編, 423頁, 1996; Cease, K. B., および Berzofsky, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* 12:923, 1994ならびに Eldridge, J. H. ら, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993) が挙げられる。毒素標的化送達技術 (レセプター媒介標的化としても公知であり、例えば、Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) の技術) もまた、使用され得る。

【0161】

本発明のワクチンは、核酸媒介様式を含む。本発明のペプチドの1以上をコードするDNAまたはRNAもまた、患者に投与され得る。このアプローチは、例えば、Wolff ら, *Science* 247:1465 (1990) ならびに米国特許第5, 580, 859号; 同第5, 589, 466号; 同第5, 804

、566号；同第5、739、118号；同第5、736、524号；同第5、679、647号；WO 98/04720；および以下により詳細に記載される。DNAベースの送達技術の例には、「裸のDNA」、促進された（ブピバカイン（bupivacaine）、ポリマー、ペプチド-媒介）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介送達（「遺伝子銃」）または圧力媒介送達（例えば、米国特許第5、922、687号を参照のこと）が挙げられる。

【0162】

治療または予防免疫目的のために、本発明のペプチドはまた、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって発現され得る。発現ベクターの例としては、弱毒化ウイルス宿主（例えば、ワクチンまたは鶏痘）が挙げられる。このアプローチの例として、ワクシニアウイルスが、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するためのベクターとして使用される。腫瘍を有する宿主への導入の際に、組換えワクシニアウイルスは、免疫原性ペプチドを発現し、そしてそれによって、宿主にCTLおよび/またはHTL応答を惹起させる。疫疹ベクターおよび免疫化プロトコルにおいて有用な方法は、例えば、米国特許第4、722、848号に記載される。別のベクターは、BCG（カルメット-ゲラン杆菌）である。BCGベクターは、Stoverら、Nature 351:456-460（1991）に記載される。本発明のペプチドの治療的投与または免疫化のために有用な広範な種々の他のベクター（例えば、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスのベクター、レトロウイルスベクター、Salmonella typhi ベクター、解毒炭疽毒素ベクターなど）は、本明細書中の説明から当業者に明らかである。

【0163】

さらに、本発明に従うワクチンは、特許請求されたペプチドの1つ以上の組成物を包含する。ペプチドは、ワクチン中に、個々に存在し得る。あるいは、このペプチドは、同じペプチドの複数のコピーを含むホモポリマーとして、または種々のペプチドのヘテロポリマーとして存在し得る。ポリマーは、免疫学的反応の増加という利点を有し、そして異なるペプチドエピトープが、ポリマーを作り上げるために使用される場合、免疫応答について標的化された病原性生物または腫

瘍関連ペプチドの異なる抗原決定基と反応する抗体および／またはCTLを誘導するさらなる能力を有する。組成物は、抗原の天然に存在する領域であり得るか、または例えば、組換え的に、または化学合成によって調製され得る。

【0164】

本発明のワクチンとともに使用されるキャリアは、当該分野で周知であり、そして例えば、サイログロブリン、ヒト血清アルブミンのようなアルブミン、破傷風トキシノイド、ポリアミノ酸（例えば、ポリL-リジン、ポリL-グルタミン酸）、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などが挙げられる。このワクチンは、生理学的に許容可能な（すなわち、受容可能な）希釈剤（例えば、水、または生理食塩水、好ましくはリン酸緩衝生理食塩水）を含み得る。このワクチンはまた、代表的に、アジュバントを含む。不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはミョウバンのようなアジュバントは、当該分野で周知の材料の例である。さらに、本明細書中に記載されるように、CTL応答は、本発明のペプチドを脂質（例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルシステニルセリル-セリン（P₃CSS））に結合することによってブライムされ得る。

【0165】

注射、エアロゾル、経口、経皮、経粘膜、胸膜腔内、鞘内または他の適切な経路を介する、本発明に従うペプチド組成物を用いる免疫化の際に、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な、多量のCTLおよび／またはHTLを生成することによって、ワクチンに応答する。その結果、この宿主は、後の感染に対して少なくとも部分的に免疫となるか、または進行中の慢性感染の発症に対して少なくとも部分的に耐性となるか、あるいは抗原が腫瘍関連である場合、少なくともいくつかの治療的利点を得る。

【0166】

いくつかの実施形態において、クラスIペプチド成分を、目的の標的抗原、特にウイルスエンベロープ抗原への中和抗体応答を誘導するか、または促進する成分と組み合わせることが所望され得る。このような組成物の好ましい実施形態は、本発明に従うクラスIおよびクラスIIエпитープを含む。このような組成物

の代替の実施形態は、PADRETM (E p i m m u n e , S a n D i e g o , C A) 分子 (例えば、米国特許第5, 736, 142号に記載される) とともに、本発明に従うクラスIおよび/またはクラスIIエпитープを含む。

【0167】

本発明のワクチンはまた、本発明のペプチドを提示するためのビヒクルとして、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞) を含み得る。ワクチン組成物は、樹状細胞の可動化および採取に続き、インビトロで作製され得、これによって、樹状細胞の負荷がインビトロで起こる。例えば、樹状細胞は、例えば、本発明に従うミニ遺伝子でトランスフェクトされる。次いで、この樹状細胞が、インビボで免疫応答を惹起するために、患者に投与され得る。

【0168】

同様に、抗原性ペプチドが、エキソビボでCTLおよび/またはHTL応答を惹起するために使用される。得られるCTLまたはHTL細胞は、治療の他の従来の形態に应答しない、または本発明に従う治療的ワクチンペプチドまたは核酸に应答しない患者における腫瘍を処置するために使用され得る。特定の腫瘍関連抗原へのエキソビボCTLまたはHTL応答は、抗原提示細胞 (APC) (例えば、樹状細胞) の供給源とともに、患者の、または遺伝子的に適合性のCTLもしくはHTL前駆細胞、および適切な免疫原性ペプチドを、組織培養でインキュベートすることによって誘導され得る。前駆細胞が活性化され、そしてエフェクター細胞に拡張される適切なインキュベート時間 (代表的に、約7~28日間) の後、これらの細胞は、患者に注入して戻され、ここで、それらは、それらの特異的標的細胞 (感染した細胞または腫瘍細胞) を破壊する (CTL) か、またはこれらの破壊を促進する (HTL)。トランスフェクトされた樹状細胞または、抗原提示細胞として使用され得る。

【0169】

本発明のワクチン組成物はまた、インターフェロン α のような抗ウイルス薬剤、またはウイルス感染に対する他の処置と組み合わせて使用され得る。

【0170】

好ましくは、ワクチンにおける使用のための多エпитープ性組成物において封

入のため、またはワクチンに含まれそして／またはミニ遺伝子のような核酸によってコードされる個別のエピトープを選択するためにエピトープのアレイを選択する場合、以下の原理が利用される。以下の原理の各々は、選択をなすために釣り合いを取ることが好ましい。所定のワクチン組成物に組込まれる複数のエピトープは、エピトープから誘導されるネイティブな抗原中の配列において連続であり得るが、その必要はない。

【0171】

好ましくは、ワクチンにおける使用のための多エピトープ性組成物において封入のため、またはワクチンに含まれそして／またはミニ遺伝子のような核酸によってコードされる個別のエピトープを選択するためにエピトープのアレイを選択する場合、以下の原理が利用される。HCV感染を処置するか、または予防するためのワクチンにおいて利用され得る例示的なエピトープは、表XXVI～XXIX、および表XXXIに記載される。以下の原理の各々は、選択をなすために釣り合いを取ることが好ましい。

【0172】

1.) 投与の際、HCVクリアランスと相関されることが観測されている模倣免疫応答エピトープが選択される。HLAクラスIについて、これは、HCVの少なくとも1つの抗原来の3～4エピトープを含む。HLAクラスIIについて、類似の原理が使用される；再び、3～4エピトープが、少なくとも1つのHCV抗原から選択される（例えば、Rosenbergら、Science 278:1447-1450を参照のこと）。

【0173】

2.) 免疫原性を相関付けられるように確立された必要な結合親和性を有するエピトープが選択される；HLAクラスIについて、500 nMまたはそれより小さいIC₅₀、あるいはクラスIIについて、1000 nMまたはそれより低いIC₅₀。

【0174】

3.) 十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイが、広い集団適用範囲を与えるために選択される

。例えば、少なくとも80%の集団適用範囲を有することが好ましい。モンテカルロ分析（当該分野で公知の統計の評価）は、集団適用範囲の広がりまたは重複性を評価するために使用される。

【0175】

4.) 癌関連抗原からエピトープを選択する場合、アナログを選択することが、しばしば好ましい。なぜなら、患者は、ネイティブのエピトープに対して発達した寛容性を有し得るからである。感染性疾患関連抗原についてのエピトープを選択する場合、ネイティブのエピトープまたはアナログエピトープのいずれかを選択することが好ましい。

【0176】

5.) 「入れ子型 (nested) エピトープ」といわれるエピトープが特に適切である。入れ子型エピトープは、少なくとも2つのエピトープが所定のペプチド配列において重複する場合に生じる。入れ子型ペプチド配列は、HLAクラスIおよびHLAクラスIIの両方のエピトープを含み得る。入れ子型エピトープが提供される場合、提供された配列あたり最も大きな数のエピトープを有する配列を提供することが望ましい。好ましくは、ペプチドにおける、アミノ末端エピトープのアミノ末端およびカルボキシ末端エピトープのカルボキシル末端よりも長いペプチドを提供することが回避される。より長いペプチド配列（例えば、入れ子型エピトープを含む配列）が提供される場合、病理学的または他の有害な生物学的特性を有さないことを確実にするために配列をスクリーニングすることが重要である。

【0177】

6.) 多エピトープ性タンパク質が作製される場合、またはミニ遺伝子を作製する場合、目的のエピトープを包含する最も小さなペプチドを作製することが目的である。この原理は、入れ子型エピトープを含むペプチドを選択する場合に使用されるものと同じでない場合に、類似する。しかし、人工の多エピトープ性ペプチドの場合、サイズを最小化する目的は、多エピトープ性タンパク質中のエピトープの間の任意のスペーサー配列を組込む必要性に対して釣り合いが取られる。スペーサーアミノ酸残基は、接合部エピトープ（免疫系によって認識されるが

、標的抗原に存在せず、そしてエピトープの人工並位 (man-made juxtaposition) によって作製されるのみのエピトープ) を回避するために、またはエピトープ間の切断を容易にし、それによってエピトープ提示を増強するために、導入され得る。接合部エピトープは、一般に、回避される、なぜなら、レシピエントは、非ネイティブエピトープに対する免疫応答を生成し得るからである。「優性エピトープ」である接合部エピトープが、特に関係する。優性エピトープは、他のエピトープに対する免疫応答が減少されるかまたは抑制される激しい (zealous) 応答を導き得る。

【0178】

上の基準に基づいて設計される多エピトープ性ワクチン組成物の例としては、HCVポリタンパク質のコア、S、E1、NS1/E2、NS2、NS3、NS4、およびNS5ドメイン由来のエピトープが挙げられる。これらの領域は、プロタイプHCV-1株に対して番号付けを使用する以下のアミノ酸配列 (Genbank登録番号M62321; 例えば、米国特許第5,683,864号および同第5,670,153号) を包含する: Cドメイン (アミノ酸1~120); S (アミノ酸120~400); NS3 (アミノ酸1050~1640); NS4 (アミノ酸1640~2000); NS5 (アミノ酸2000~3011); およびエンペロープタンパク質E1およびE2/NS1 (アミノ酸192~750を含む)。アミノ酸750~1050は、本発明に適用されるように、ドメインXと命名される。当業者に理解されるように、各ドメインについてのアミノ酸の範囲の表示は、HCVの株に依存してHCV-1の範囲からある程度異なり得る。HCVポリタンパク質配列で見える場合、当業者は、ドメイン境界を容易に決定可能である。

【0179】

本発明の多エピトープ性組成物の特定の実施形態は、薬学的に受容可能なキャリアおよびHCV-1のペプチドと免疫学的に交差反応性であるモチーフ保有ペプチドの組み合わせを含む薬学的組成物を含み、ここで、ペプチドの少なくとも1つは、表Iaのモチーフを保有し、さらにここで、モチーフ保有ペプチドの組み合わせは、以下からなる: a) HCV Cドメイン由来の少なくとも8アミノ

酸を含む1つ以上のペプチド；b) 以下からなる群から選択されるさらなるドメインの少なくとも8アミノ酸を含む1つ以上のペプチド：Sドメイン、NS3ドメイン、NS4ドメイン、またはNS5ドメイン、および；c) 必要に応じて、1つ以上のさらなるHCVドメイン由来の1つ以上のモチーフ保有ペプチド（ただし、さらなるドメインが「b」に列挙されるさらなるドメインではない）。好ましくは、このような薬学的組成物は、さらに、Xドメインの少なくとも8アミノ酸を含む1つ以上の個別のHCVモチーフ保有ペプチドを含み得るか、あるいはこの組成物はさらに、エンペロープドメイン由来であるさらなるHCVモチーフ保有ペプチドを含み得、このエンペロープドメインペプチドは、エンペロープドメインの少なくとも8アミノ酸を含む単一のHCVペプチドの1つ以上のコピーからなる。

【0180】

別の実施形態において、多エピトープ性の薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアおよびHCV-1ペプチドと免疫学的に交差反応性であるモチーフ保有ペプチドの組み合わせを含み得、これらのペプチドは、HCVの複数のドメイン由来であり、ここで、これらのペプチドの少なくとも1つは、表I aのモチーフを保有し、そしてここで、モチーフ保有ペプチドの組み合わせは、本質的に以下からなる：a) Cドメイン由来の少なくとも8アミノ酸を含む1つ以上のペプチド；およびb) S、NS3、NS4、またはNS5ドメイン由来の少なくとも8アミノ酸を含む1つ以上のペプチド、ならびにエンペロープドメインの少なくとも8アミノ酸を含む1つのHCVペプチド。このような組成物は、さらに、Xドメインの少なくとも8アミノ酸を含む1つ以上のHCVモチーフ保有ペプチドを含み得る。

【0181】

あるいは、本発明の薬学的組成物は、以下を含み得る：a) 薬学的に受容可能なキャリア；および、b) 1つ以上のC型肝炎ウイルス（HCV）ドメイン由来の少なくとも8アミノ酸の1つ以上のモチーフ保有ペプチドの組み合わせであって、ここで、上記ペプチドは、HCV-1のペプチドと交差反応性であるが、ただし、組み合わせは、HCV Cドメイン由来の少なくとも8アミノ酸のペプチド

ドを含まず、そしてここで、これらのペプチドの少なくとも1つは、表I aのモチーフを保有し、上記ドメインは、Sドメイン；NS3ドメイン；NS4ドメイン；NS5ドメイン；および、Xドメインからなる群から選択される、モチーフ保有ペプチドの組み合わせ。このような組成物は、さらに、エンベロップドメインの少なくとも8アミノ酸を含む単一HCVペプチドの1つ以上のコピーからなるモチーフ保有HCVエンベロップペプチドを含み得る。

【0182】

最後に、本発明の実施形態は、薬学的に受容可能なキャリアおよびHCV-1株の単一ドメイン由来の2つ以上のモチーフ保有ペプチドの組み合わせを含む薬学的組成物を含み得、上記ペプチドは、HCV-1抗原のペプチドと免疫学的に交差反応性であり、ここで、これらのペプチドの少なくとも1つは、表I aのモチーフを保有し、そしてこれらのペプチドは、HCV由来であり、そしてHCVドメインは、以下からなる群から選択される：Cドメイン；Sドメイン；NS3ドメイン；NS4ドメイン；NS5ドメイン；Xドメイン；または、単一HCV株由来のエンベロップドメイン。但し、エンベロップドメインは、可変エンベロップドメイン以外である。

【0183】

記載される実施形態において、「HCV-1と免疫学的に交差反応性であるペプチド」とは、同じ抗体によって結合されたペプチドをいう；「由来の」とは、そのフラグメントまたは部分配列および保存的に改変された改変体をいう。

【0184】

(IV. K. 1. ミニ遺伝子ワクチン)

複数のエピトープの同時送達を可能にする多くの異なるアプローチが利用可能である。本発明のペプチドをコードする核酸は、特に有用な、本発明の実施形態である。ミニ遺伝子の封入のためのエピトープは、好ましくは、前節に記載されるガイドラインに従って選択される。本発明のペプチドをコードする核酸を投与する好ましい手段は、本発明の1または複数のエピトープを含むペプチドをコードするミニ遺伝子構築物を使用する。

【0185】

多重エピトープミニ遺伝子の使用は、以下および例えば、同時係属出願U. S. S. N. 09/311, 784; An, L. およびWhitton, J. L., J. Virol. 71:2292, 1997; Thomson, S. A. ら, J. Immunol. 157:822, 1996; Whitton, J. L. ら, J. Virol. 67:348, 1993; Hanke, R. ら, Vaccine 16:426, 1998に記載される。例えば、HCVポリタンパク質配列の複数の領域由来のスーパーモチーフ保有HCVエピトープおよび/またはモチーフ保有HCVエピトープをコードする多重エピトープDNAプラスミド、P ADRE™万能(universal)ヘルパーT細胞エピトープ(またはHCV由来の複数のHTLエピトープ)、および小胞体-転位シグナル配列が操作され得る。

【0186】

多重エピトープミニ遺伝子の免疫原性は、試験されるエピトープに対するCTL誘導応答の大きさを評価するために、トランスジェニックマウスにおいて試験され得る。さらに、インビボでのDNAコードエピトープの免疫原性は、DNAプラスミドでトランスフェクトされた標的細胞に対する特定のCTL株のインビトロ応答と相関され得る。従って、これらの実験は、ミニ遺伝子が、1.) CTL応答を生成すること、そして2.) 誘導されたCTLが、コードされたエピトープを発現する細胞を認識することの両方に役立つということを示し得る。

【0187】

例えば、ヒト細胞における発現のための選択されたエピトープ(ミニ遺伝子)をコードするDNA配列を作製するために、これらのエピトープのアミノ酸配列を逆転写し得る。ヒトコドン使用頻度表を使用して、各アミノ酸についてのコドン選択を導き得る。これらのエピトープコードDNA配列は、翻訳された場合に、連続的なポリペプチド配列が作製されるように、直接的に隣接され得る。発現および/または免疫原性を最適化するために、さらなるエレメントが、そのミニ遺伝子設計に組み込まれ得る。逆転写され得、そしてそのミニ遺伝子配列に含まれ得るアミノ酸配列の例としては、以下が挙げられる：HLAクラスIエピトープ、HLAクラスIIエピトープ、ユビキチン化シグナル配列および/または小

胞体ターゲットイングシグナル。さらに、CTLエпитープおよびHTLエピトープのHLA提示は、そのCTLエピトープまたはHTLエピトープに隣接する、合成の（例えば、ポリアラニン）または天然に存在する隣接配列を含むことによって改変され得；そのエピトープを含むこれらのより大きいペプチドは、本発明の範囲内にある。

【0188】

ミニ遺伝子配列は、ミニ遺伝子の+鎖および-鎖をコードするオリゴヌクレオチドをアセンブルすることによってDNAに変換され得る。重複オリゴヌクレオチド（30～100塩基長）が、周知技術を使用して適切な条件下で、合成、リン酸化、精製およびアニーリングされ得る。これらのオリゴヌクレオチドの末端は、例えば、T4 DNAリガーゼを使用して連結され得る。次いで、エピトープポリペプチドをコードする、この合成ミニ遺伝子は、所望の発現ベクターにクローニングされ得る。

【0189】

好ましくは、当業者に周知の標準的な調節配列が、標的細胞における発現を確実にするためにベクターに含まれる。以下のいくつかのベクターエレメントが所望される：ミニ遺伝子挿入物のための下流クローニング部位を含むプロモーター；効率的な転写終結のためのポリアデニル化シグナル；E. coli複製起点；およびE. coli選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性またはカナマイシン耐性）。多くのプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）プロモーター）が、この目的に使用され得る。他の適切なプロモーター配列については、例えば、米国特許第5,580,859号および米国特許第5,598,466号を参照のこと。

【0190】

さらなるベクター改変が、ミニ遺伝子の発現および免疫原性を最適化するために所望され得る。いくつかの場合において、イントロンが、効率的な遺伝子発現に必要とされ、そして1以上の合成イントロンまたは天然に存在するイントロンが、ミニ遺伝子の転写される領域に組み込まれ得る。mRNA安定化配列および哺乳動物細胞における複製のための配列の包含もまた、ミニ遺伝子発現を増大す

るために考慮され得る。

【0191】

一旦、発現ベクターを選択すると、ミニ遺伝子を、プロモーターの下流のポリリンカー領域内にクローニングする。このプラスミドを、適切な *E. coli* 株に形質転換し、そしてDNAを、標準的な技術を使用して調製する。ミニ遺伝子の方向およびDNA配列、ならびにベクターに含まれる他の全てのエレメントは、制限マッピングおよびDNA配列分析を使用して確認される。正しいプラスミドを保有する細菌細胞は、マスター (master) 細胞バンクおよびワーキング (working) 細胞バンクとして保存される。

【0192】

さらに、免疫刺激配列 (ISSまたはCpG) は、DNAワクチンの免疫原性において役割を果たすようである。これらの配列は、免疫原性の増強が所望される場合に、そのベクター中のミニ遺伝子コード配列の外側に含まれ得る。

【0193】

いくつかの実施形態において、ミニ遺伝子コードエピトープおよび第2のタンパク質 (免疫原性を増強または減少するために含まれる) の両方の産生を可能にする、二シストロン性 (bi-cistronic) 発現ベクターが使用され得る。同時発現される場合に免疫応答を有利に増強し得るタンパク質またはポリペプチドの例としては、サイトカイン (例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF)、サイトカイン誘導分子 (例えば、LeIF)、同時刺激分子、またはHTL応答について、汎DR結合 (pan-DR binding) タンパク質 (PADRE™、Epimmune、San Diego、CA) が挙げられる。ヘルパー (HTL) エピトープは、細胞内ターゲティングシグナルに結合され得、そして発現されるCTLエピトープとは別々に発現され；これは、CTLエピトープとは異なる、HTLエピトープの細胞区画への指向を可能にする。必要ならば、これは、HLAクラスII経路へのHTLエピトープのより効率的な進入を促進し得、これによって、HTL誘導を改善する。HTL誘導またはCTL誘導とは対照的に、免疫抑制分子 (例えば、TGF- β) の同時発現によって免疫応答を特異的に減少することが、特定の疾患において有利であり得る。

【0194】

治療量のプラスミドDNAは、例えば、E. coli 中での発酵、その後の精製によって生成され得る。ワーキング細胞バンク由来のアリコートを使用して、培養培地に播種し、そして周知技術に従って、シェーカーフラスコまたはバイオリアクター中で飽和になるまで増殖させる。プラスミドDNAを、標準的なバイオ分離技術（例えば、QIAGEN, Inc. (Valencia, California) によって供給される固相陰イオン交換樹脂）を使用して精製し得る。必要ならば、スーパーコイルDNAを、ゲル電気泳動または他の方法を使用して、開環形態および線状形態から分離し得る。

【0195】

精製プラスミドDNAは、種々の処方物を使用して、注入用に調製され得る。これらの最も単純なものは、滅菌リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中での凍結乾燥化DNAの再構成である。このアプローチ（「裸のDNA」としても知られる）は、臨床試験において筋内（IM）投与のために現在使用されている。ミニ遺伝子DNAワクチンの免疫治療効果を最大化するために、精製プラスミドDNAを処方するための代替の方法が望ましくあり得る。種々の方法が記載されており、そして新しい技術が利用可能になるかもしれない。カチオン性脂質もまた、処方物中で使用され得る（例えば、WO93/24640; ManninoおよびGould-Fogerite, BioTechniques 6(7):682 (1988); 米国特許第5,279,833号; WO91/06309; およびFelgnerら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413 (1987) に記載されるような）。さらに、糖脂質、紡錘型（fusogenic）のリポソーム、ペプチドおよび化合物（まとめて、保護的、相互作用的、非凝縮化合物（PINC）と呼ばれる）もまた、精製プラスミドDNAに複合体化され得、安定性、筋内分散、または特定の器官または細胞型に対する輸送のような変数に影響する。

【0196】

標的細胞の感作が、ミニ遺伝子コードCTLエピトープの発現およびHLAクラスII提示についての機能的アッセイとして使用され得る。例えば、プラスミド

DNAが、標準的なCTLクロム放出アッセイについての標的として適切である哺乳動物細胞株に導入される。使用されるトランスフェクション方法は、最終処方物に依存する。エレクトロポレーションは、「裸の」DNAのために使用され得、一方、カチオン性脂質が、直接的なインビトロトランスフェクションを可能にする。グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を発現するプラスミドを同時トランスフェクトして、蛍光標式細胞分取 (FACS) を使用する、トランスフェクトした細胞の富化を可能にし得る。次いで、これらの細胞を、クロム51 (^{51}Cr) 標識し、そしてエпитープ特異的CTL株についての標的細胞として使用し、 ^{51}Cr 放出によって検出される細胞溶解が、ミニ遺伝子コードCTLエпитープの産生およびHLA提示の両方を示す。HTLエпитープの発現は、HTL活性を評価するためのアッセイを使用して、類似の様式で評価され得る。

【0197】

インビボ免疫原性は、ミニ遺伝子DNA処方物の機能的試験のための第2のアプローチである。適切なヒトHLAタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを、このDNA産物で免疫する。投与の用量および経路は、処方物依存性である (例えば、PBS中のDNAについてはIM、脂質複合体化DNAについては腹腔内 (IP))。免疫後21日で、脾細胞を収集し、試験する各エпитープをコードするペプチドの存在下で1週間再刺激する。その後、CTLエフェクター細胞について、標準的な技術を使用して、ペプチドがロードされた ^{51}Cr 標識細胞の細胞溶解についてのアッセイを行う。ペプチドエпитープ (ミニ遺伝子コードエпитープに対応する) でロードされたHLAによって感作された標的細胞の溶解は、CTLのインビボ誘導についてのDNAワクチン機能を実証する。HTLエпитープの免疫原性は、類似の様式でトランスジェニックマウスにおいて評価される。

【0198】

あるいは、核酸は、例えば、米国特許第5,204,253号に記載されるような、銃式 (ballistic) 送達を使用して投与され得る。この技術を使用して、DNAのみから構成される粒子が投与される。さらなる代替の実施形態において、DNAは、粒子 (例えば、金粒子) に接着され得る。

【0199】

(IV. K. 2. CTLペプチドとヘルパーペプチドとの組み合わせ)

免疫刺激活性を有する、本発明のペプチドまたはそのアナログを含むワクチン組成物は、所望の特性（例えば、改善された血清半減期）を提供するように、または免疫原性を増強するように改変され得る。

【0200】

例えば、CTL活性を誘導するペプチドの能力は、Tヘルパー細胞応答を誘導し得る少なくとも1つのエピトープを含む配列にペプチドを連結させることによって増強され得る。免疫原性を増強するためのCTLエピトープと組み合わせたTヘルパーエピトープの使用は、例えば、同時係属中の米国特許出願第08/820360号、米国特許出願第08/197,484号、および米国特許出願第08/464,234号に例示される。

【0201】

特に好ましいCTLエピトープ/HTLエピトープ結合体は、スパーサー分子によって連結される。スパーサーは、代表的に、比較的小さい、中性の分子（例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物）からなり、これらは、生理学的条件下で実質的に非荷電性である。スパーサーは、代表的に、例えば、Ala、Glyあるいは非極性アミノ酸または中性極性アミノ酸の他の中性スパーサーから選択される。任意に存在するスパーサーは、必ずしも同じ残基からなる必要はなく、従って、ヘテロオリゴマーであっても、ホモオリゴマーであってもよいことが理解される。存在する場合、スパーサーは、通常、少なくとも1残基または2残基であり、より通常は、3～6残基である。あるいは、CTLペプチドは、スパーサーなしでTヘルパーペプチドに連結され得る。

【0202】

CTLペプチドエピトープは、Tヘルパーペプチドエピトープに直接連結され得るが、しばしば、CTLエピトープ/HTLエピトープ結合体は、スパーサー分子に連結される。スパーサーは、代表的に、比較的小さい、中性の分子（例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物）からなり、これらは、生理学的条件下で実質的に非荷電性である。スパーサーは、代表的に、例えば、Ala、Glyある

いは非極性アミノ酸または中性極性アミノ酸の他の中性スパーサーから選択される。任意に存在するスパーサーは、必ずしも同じ残基からなる必要はなく、従って、ヘテロオリゴマーであっても、ホモオリゴマーであってもよいことが理解される。存在する場合、スパーサーは、通常、少なくとも1残基または2残基であり、より通常は、3～6残基である。CTLペプチドエピトープは、CTLペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで、直接的にかまたはスパーサーを介してかのいずれかで、Tヘルパーペプチドエピトープに連結され得る。免疫原性ペプチドまたはTヘルパーペプチドのいずれかのアミノ末端は、アシル化され得る。

【0203】

HTLペプチドエピトープはまた、それらの生物学的特性を変更するために改変され得る。例えば、HTLエピトープを含むペプチドは、D-アミノ酸を含み、プロテアーゼに対するそれらの耐性を増加し得、従って、それらの血清半減期を伸ばし得る。また、本発明のエピトープペプチドは、他の分子（例えば、脂質、タンパク質または糖、あるいは任意の他の合成化合物）に結合体化され得、それらの生物学的活性を増加する。詳細には、Tヘルパーペプチドは、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかで1以上のパルミチン酸鎖に結合体化され得る。

【0204】

特定の実施形態において、Tヘルパーペプチドは、その集団の大部分で存在するTヘルパー細胞によって認識されるペプチドである。これは、多くの、ほとんどの、または全てのHLAクラスII分子に結合するアミノ酸配列を選択することによって達成され得る。これらは、「大まかなHLA拘束」または「不規則な」Tヘルパー配列として知られる。不規則なアミノ酸配列の例としては、以下のような抗原由来の配列が挙げられる：破傷風トキソイドの830～843位（QYIKANSKFITE）、*Plasmodium falciparum* C5タンパク質の378～398位（DIEKKIAKMEKASSVFNVNS）および*Streptococcus* 18kDタンパク質の116位（GAVDSILGGVATYGAA）。他の例としては、DR 1-4-7スー

パーモチーフ、またはDR3モチーフのいずれかを保有するペプチドが挙げられる。

【0205】

あるいは、天然に見い出されないアミノ酸配列を使用して、大まかなHLA拘束様式で、Tヘルパーリンパ球を刺激し得る合成ペプチドを調製し得る（例えば、PCT公開WO95/07707を参照のこと）。汎DR結合（pan-DR binding）エпитープと呼ばれるこれらの合成化合物（例えば、PADRE™、Epimmune, Inc., San Diego, CA）は、最も好ましくは、ほとんどのHLA-DR（ヒトHLAクラスII）分子を結合するように設計される。例えば、式：aKXVWANTLKAAa（ここで、「X」は、シクロヘキシルアラニン、フェニルアラニンまたはチロシンのいずれかであり、そしてaは、D-アラニンまたはL-アラニンのいずれかである）を有する、汎DR結合エпитープペプチドは、ほとんどのHLA-DR対立遺伝子に結合し、そしてほとんどの個体由来（それらのHLA型に拘わらず）のTヘルパーリンパ球の応答を刺激することが見い出されている。汎DR結合エпитープの代替物は、全て「L」天然アミノ酸を含み、そしてこのエпитープをコードする核酸の形態で提供され得る。

【0206】

いくつかの実施形態において、本発明の薬学的組成物中に、細胞傷害性Tリンパ球をブライムする少なくとも1つの成分を含むことが望ましくあり得る。脂質は、ウイルス抗原に対してCTLをインビボでブライムし得る因子として同定されている。例えば、バルミチン酸残基は、リジン残基のε-アミノ基およびα-アミノ基に結合され得、次いで、例えば、Gly、Gly-Gly、Ser、Ser-Serなどのような1以上の連結残基を介して、免疫原性ペプチドに連結され得る。次いで、この脂質化ペプチドは、ミセルまたは粒子のいずれかで直接的に投与され得るか、リボソーム内に組み込まれ得るか、またはアジュバント（例えば、不完全フロイントアジュバント）中で乳化され得る。好ましい実施形態において、特に効果的な免疫原性ペプチドは、Lysのε-アミノ基およびα-アミノ基に結合されたバルミチン酸を含み、これは、その免疫原性ペプチドの

アミノ末端に連結（例えば、Ser-Ser）を介して結合される。

【0207】

CTL応答をブライムする脂質の別の例として、E. coli リポタンバク質（例えば、トリパルミトイル-S-グリセリルスチニルセリル-セリン（P₃ CSS））が、適切なペプチドに共有結合された場合にウイルス特異的CTLをブライムするために使用され得る（例えば、Deresら、Nature 342:561、1989を参照のこと）。本発明のポリペプチドは、例えば、P₃ CSSに結合され得、そしてこのリポペプチドが、個体に投与され、標的抗原に対するCTL応答を特異的にブライムし得る。さらに、中和抗体の誘導もまた、P₃ CSS結合体化エピトープでブライムされ得るので、2つのこのような組成物を組み合わせて、感染に対する体液性応答および細胞性応答の両方をより効果的に誘発し得る。

【0208】

本明細書中に示されるように、さらなるアミノ酸がペプチドの末端に付加され、ペプチドの互いの容易な連結、キャリア支持体またはより大きいペプチドへの結合、ペプチドまたはオリゴペプチドの物理的特性または化学的特性の改変などを提供し得る。チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸またはアスパラギン酸などのアミノ酸が、ペプチドまたはオリゴペプチド（特に、クラスIペプチド）のC末端またはN末端に導入され得る。しかし、いくつかの場合において、CTLエピトープのカルボキシル末端での改変は、ペプチドの結合特性を変更し得ることに留意すべきである。さらに、ペプチドまたはオリゴペプチド配列は、末端NH₂アシル化（例えば、アルカノイル（C₁~C₂₀）アセチル化またはチオグリコリルアセチル化）、末端カルボキシルアミド化（例えば、アンモニア、メチルアミンなど）によって改変されることによって、天然の配列とは異なり得る。いくつかの例において、これらの改変は、支持体または他の分子に連結するための部位を提供し得る。

【0209】

（CTLペプチドおよび／またはHTLペプチドをパルスした樹状細胞を含むワクチン組成物）

本発明に従うワクチン組成物の実施形態は、患者の血液由来のP B M C（またはそこから単離されたD C）へのエビトープ保有ペプチドの混液のエキソビボ投与を包含する。D Cの収集を容易にするための医薬（例えば、G M - C S F / I L - 4）が使用され得る。ペプチドでのD Cのパルス後および患者への再注入の前に、D Cを洗浄し、結合されなかったペプチドを除去する。この実施形態において、ワクチンは、ペプチドをパルスしたD Cを含み、このペプチドをパルスしたD Cは、その表面上でH L A分子と複合体化された、そのパルスされたペプチドエビトープを提示する。次いで、このワクチンは、患者に投与される。

【0210】

（I V . L . 治療目的または予防目的のためのワクチンの投与）

本発明のペプチドならびに本発明の薬学的組成物およびワクチン組成物は、H C V感染を処置および／または予防するための哺乳動物（特に、ヒト）への投与に有用である。本発明のペプチドを含むワクチン組成物は、H C Vに感染した患者、あるいはH C V感染に感受性の個体またはそうでなければH C V感染の危険性がある個体に投与され、H C V抗原に対する免疫応答を誘発し、従って、患者自身の免疫応答能力を増強する。治療適用において、ペプチド組成物および／または核酸組成物は、ウイルス抗原に対する効果的なC T Lおよび／またはH T L応答を誘発するのに、ならびに症状および／または合併症を治療または少なくとも部分的に阻止または遅延するのに十分な量で患者に投与される。このことを達成するための十分な量は、「治療的有效用量」として定義される。この用途のために効果的な量は、例えば、投与される特定の組成物、投与の形態、処置される疾患の段階および重篤度、患者の体重および一般的な健康状態、ならびに処方する医師の判断に依存する。

【0211】

本発明のワクチン組成物はまた、予防薬剤として純粋に使用され得る。一般に、初回の予防免疫のための用量は、一般に、単位投薬範囲にあり、低い値で、約1、5、50、500または1000 μ g、そして高い値で、約10、000；20、000；30、000；または50、000 μ gである。ヒトについての投薬値は、代表的に、70キログラム患者当たり、約500 μ g～約50、000

0 μ g の範囲である。これに続いて、約1.0 μ g ～約50,000 μ g の間のペプチドの投薬量で追加免疫する。このペプチドは、ワクチンの初回投与後、約4週間～6ヶ月の規定された間隔で投与される。このワクチンの免疫原性は、患者の血液のサンプルから得たCTLおよびHTLの比活性を測定することによって評価され得る。

【0212】

上記のように、本発明のCTLエпитープおよび/またはHTLエпитープを含むペプチドは、HLA分子によって提示され、そしてそのペプチドに含まれるエпитープに特異的なCTLまたはHTLを接触された場合に、免疫応答を誘発する。このペプチドがCTLまたはHTLを接触される様式は、本発明に重要ではない。例えば、このペプチドは、インビボまたはインビトロのいずれかでCTLまたはHTLを接触され得る。その接触がインビボで生じる場合、ペプチド自体が患者に投与され得るか、他のビヒクル（例えば、1以上のペプチドをコードするDNAベクター、ペプチドをコードするウイルスベクター、リボソームなど）が、本明細書に記載のように、使用され得る。ペプチドがインビトロで接触される場合、ワクチン接種薬剤は、細胞の集団（例えば、ペプチドをパルスした樹状細胞、TAA特異的なCTL（これは、このペプチドをインビトロで抗原提示細胞にパルスすることによって誘導された））を含み得る。このような細胞集団は、その後、治療の有効用量で患者に投与される。

【0213】

ペプチドまたはペプチドをコードするDNAは、個々に投与され得るか、または1以上のペプチド配列の融合体として投与され得る。

【0214】

薬学的組成物のために、本発明の免疫原性ポリペプチド、またはそれらをコードするDNAは、一般に、HCVに既に感染した患者に投与される。これらのペプチドまたはそれらをコードするDNAは、個々に投与され得るか、または1以上のペプチド配列の融合体として投与され得る。感染の潜伏期または急性期にある個体は、それらの免疫原性ペプチドで別々に処置されるか、または他の処置と適切に組み合わせて処置され得る。

【0215】

治療の用途のために、投与は、一般に、HCV感染の最初の診断で開始すべきである。この後に、少なくとも症状が実質的に寛解されるまで、およびその後の期間の間で、追加免疫用量を行う。慢性感染において、負荷用量、その後の追加免疫用量が、必要とされ得る。

【0216】

本発明の組成物での感染した個体の処置は、急性に感染した個体における感染の消散を促進し得る。慢性感染の発症に感受性（または、その素因がある）の個体のために、これらの組成物は、急性から慢性の感染への進化を妨げるための方法において特に有用である。感受性の個体が、感染前または感染中に同定される場合、その組成物を、それらの個体に標的化し得、これにより、より大きい集団への投与の必要性を最小化する。

【0217】

HCV感染の処置または予防のために使用されるペプチドもしくは他の組成物が、例えば、疾患の明らかな症状を有しないが、疾患媒介者として作用するヒトにおいて使用され得る。この文脈において、細胞傷害性T細胞応答を有効的に刺激するのに十分な投与の様式により送達されるペプチドエピトープの一定量を提供することが一般的に重要であり、ヘルパーT細胞応答を刺激する組成物もまた、本発明のこの実施形態に従って与えられ得る。

【0218】

初期の治療的免疫化のための投薬量は、単位投薬量範囲において一般的に生じ、ここで、そのより低い値は約1、5、50、500または1000 μ gであり、そしてより高い値は、約10,000；20,000；30,000；または50,000 μ gである。ヒトに対する投薬量値は、代表的に、70kgの患者につき、約500 μ g～約50,000 μ gの範囲に渡る。数週間～数ヶ月に渡るブースト養生法に従う、約1,0 μ g～約50000 μ gの間のペプチドのブースター投薬量は、患者の血液から得られるCTLおよびHTLの比活性を測定することにより決定される患者の応答および状態に依存して投与され得る。本発明のペプチドおよび組成物は、重篤な疾患状態（すなわち、生命を脅かす状況ま

たは潜在的に生命を脅かす状況)において使用され得る。そのような場合において、本発明の好ましい組成物における最小量の外来基質および相対的非毒性のペプチドの結果として、これらの規定された投薬量に対して、実質的に過剰なこれらのペプチド組成物を投与することが可能であり、そして治療医師により所望されると感じられ得る。

【0219】

従って、慢性感染の処置のために、代表的な用量は、上記の開示範囲内(すなわち、より低い値は約1、5、50、500または1000 μ gであり、そしてより高い値は、約10,000;20,000;30,000;または50,000 μ gであり、好ましくは、70kgの患者につき約500 μ g~約50,000 μ g)にある。初期用量に次いでブースター用量が、確立された間隔(例えば、4週間~6ヶ月)において、個体を有効的に免疫化するように延長された期間でおそらく必要とされ得る。慢性感染の場合において、投与は、少なくとも臨床的症状または実験室の試験が、そのウイルス感染が除去されるか、または実質的に無効にされることを示すまでおよびその後の一定期間の間継続すべきである。投薬量、投与経路および用量スケジュールは、当該分野において公知の方法論に従って調整される。

【0220】

治療処置のための薬学的組成物は、非経口投与、局所的投与、経口投与、髄腔内投与または局所投与のために意図される。好ましくは、この薬学的組成物は、非経口的(例えば、静脈内、皮下、皮内、または筋肉内)に投与される。従って、本発明は、非経口投与のための組成物を提供し、この組成物は、受容可能なキャリア(好ましくは、水性キャリア)に溶解されているか、または懸濁されている免疫原性ペプチドの溶液を含む。種々の水性キャリア(例えば、水、緩衝水、0.8%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸など)が使用され得る。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得るか、または滅菌濾過され得る。得られた水溶液は、そのままもしくは凍結乾燥された状態での使用のために包装され得、凍結乾燥された調製物は、投与の前に滅菌溶液と合わせられる。これらの組成物は、生理学的状態に近づけるために必要とされる場

合、薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調節剤および緩衝化剤、張度調節剤、湿潤剤、防腐剤など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレアートなど））を含み得る。

【0221】

薬学的処方物中の本発明のペプチドの濃度は、広範に変動し得（すなわち、約0.1重量%未満（通常は約2重量%もしくは少なくとも約2重量%）から20重量%～50重量%以上と同程度まで）、そして選択された投与の特定様式に従って、主に流体容量、粘性などによって選択される。

【0222】

ヒト単位用量形態のペプチド組成物は、ヒト単位用量の受容可能なキャリア、好ましくは水性キャリアを含む薬学的組成物内に代表的に含まれて、そしてヒトに対してそのような組成物を投与するために使用されることが当業者に公知である一定容量の流体において投与される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、A. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985を参照のこと）。

【0223】

本発明のペプチドはまた、リボソームを介して投与され得、このリボソームは、特定の組織（例えば、リンパ組織）に対してペプチドを標的とするためか、または感染細胞に対して選択的に標的とするため、およびペプチド組成物の半減期を増加するために役に立つ。リボソームとしては、エマルジョン、泡沫、ミセル、不溶性単分子膜、液晶、リン脂質分散系、ラメラ層（lamellar layer）などが挙げられる。これらの調製物において、送達されるべきペプチドは、単独でか、もしくはリンパ系細胞の一般的なレセプターと結合する分子（例えば、CD45抗原に結合するモノクローナル抗体）と共に、または他の治療組成物もしくは免疫原性組成物と共にリボソームの一部として取り込まれる。従って、本発明の所望のペプチドで満たされているか、または装飾されているかのいずれかのリボソームは、リンパ系細胞の部位に指向され得、次いで、ここで、

そのリボソームは、そのペプチド組成物を送達する。本発明に従う使用のためのリボソームが、標準的なベシクル形成脂質から形成され、そのベシクル形成脂質としては、一般的に中性リン脂質および負電荷リン脂質ならびにステロール（例えば、コレステロール）が挙げられる。脂質の選択は、例えば、リボソームサイズ、血流におけるリボソームの酸不安定性および酸安定性を考慮して、一般的に導かれる。例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980) および米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、および同第5,019,369号に記載されるように、リボソームを調製するための種々の方法が利用可能である。

【0224】

免疫系の細胞を標的とするために、リボソーム内に組み込まれるべきリガンドは、例えば、所望の免疫系細胞の細胞表面決定基に対して特異的な抗体またはそのフラグメントを含み得る。ペプチドを含むリボソーム懸濁物は、とりわけ、投与の様式、送達されるペプチド、および処置される疾患の段階に従って変動する用量において、静脈内に、局所に (locally)、局所的 (topically) などにおいて投与され得る。

【0225】

固体組成物のために、従来の非毒性固体キャリアが使用され得、そのキャリアとしては、例えば、薬学的等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。経口投与のために、薬学的に受容可能な非毒性組成物は、通常使用される任意の賦形剤（例えば、上記に列挙されたそれらのキャリア）、および一般的に10～95%の活性成分（すなわち、本発明の1つ以上のペプチド、およびより好ましくは25%～75%の濃度にて）を取り込むことによって形成される。

【0226】

エアロゾル投与のために、免疫原性ペプチドが、界面活性剤および噴霧剤と共に微細に分割された形態で好ましくは提供される。ペプチドの代表的な割合は、

0.01重量%～20重量%であり、好ましくは1重量%～10重量%である。この界面活性剤は、当然ながら、非毒性でなければならず、そして好ましくは、噴霧剤に可溶性である。そのような薬剤の代表的なものは、6～22個の炭素原子を含む、脂肪酸のエステルまたは部分エステル（例えば、脂肪族多水酸基アルコールまたはその環状無水物とカプロン酸、オクタン酸、ラウリル酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン（olesteric）酸およびオレイン酸との）である。混合エステル（例えば、混合グリセリドまたは天然グリセリド）が使用され得る。この界面活性剤は、組成物の0.1重量%～20重量%、好ましくは0.25～5重量%を構成し得る。組成物の残りは、通常、噴霧剤である。キャリアもまた、所望される場合、例えば、鼻腔内送達のためにレシチンと共に含まれ得る。

【0227】

（IV. M. キット）

本発明のペプチドおよび核酸組成物は、ワクチン投与のための指示と共にキット中で提供され得る。代表的には、そのキットは、容器中の、好ましくは、単位用量形態の所望のペプチド組成物および投与についての指示書を含む。別のキットは、投与についての指示書と共に、好ましくは、単位用量形態で容器中に本発明の所望の核酸を有するミニ遺伝子構築物を含む。IL-2またはIL-12などのリンホカインはまた、そのキットに含まれ得る。また所望され得る他のキット構成成分としては、例えば、滅菌シリンジ、追加免疫用量、および他の所望の賦形剤が挙げられる。

【0228】

本発明は、特定の実施例によってより詳細に記載される。以下の実施例は、例示的な目的について提供され、そして、いずれの方法においても本発明を制限することを意図するものではない。当業者は、本発明に従って、種々の重要でないパラメーターが、別の実施形態を生じるように変化され得るかまたは改変され得ることを容易に理解する。

【0229】

（V. 実施例）

多数のウイルス疾患におけるように、HCVの除去がCTLによって媒介されるという証拠が存在する。6匹のチンパンジーにおける初期のHCV感染の研究において、4匹が慢性的感染へと進行した(Cooperら、要約、第19回日米肝炎共同パネルミーティング、1998年、1月27~29日)。これらの4匹の動物が、初期感染期間に、全くCTL応答を示さなかったか、または、非常に狭く集中した応答のいずれかを示したことを見出した。対照的に、感染を解決した残る2匹の動物では、広範なCTL応答が、複数のHCVタンパク質(そのいくつかは、保存されている)に対して観察された。Weinerら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:2755-2759, 1995)は、ウイルスエスケープ(そこで、エピトープが、変異したPATRクラスI分子に提示される)が、慢性的感染への進行に関して関連していることを示した。これらのデータは、HCV疾患の経過を方向付ける際、および持続的に感染した宿主におけるHCV種の遺伝的組成を決定する際の、CTLについての役割を示す。

【0230】

ヒトにおける研究では、Kozielらが、慢性的なHCV感染を有する患者由来の肝浸潤におけるHCV特異的CTLの存在を確立し(Kozielら、J. Immunol. 149:3339, 1992;およびKozielら、J. Virol. 67:7522, 1993)、そして、いくつかの異なったHLAクラスI分子の文脈で認識される多数のCTLエピトープをまた同定した。他の研究者らは、HCV特異的CTLが、慢性的なC型肝炎を有する患者の末梢血液において検出され得ることを示してきた(Cerryら、J. Clin. Invest. 95:521, 1995;Cernyら、Curr. Topics in Micro. and Immunol 189:169, 1994;Cernyら、Abst. 2nd International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses;La Jolla CA, 1994;Battegayら、Abst. 2nd International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses;La Jolla, CA, 1994;Shira

ら、J. Virol. 68:3334, 1994; Shiraiら、J. Immunol. 154:2733, 1995; Battagayら、J. Virol. 69:2462, 1995)。さらに、エスケープ改変体が、慢性的にHCVに感染した患者において示されてきた(Changら、J. Clin. Invest. 100:2376-2385, 1997; Tsaiら、Gastroenterology 115:954-966, 1998)。

【0231】

概して、HCV感染患者で観察されるCTL応答の規模は、慢性的なB型肝炎感染の場合に観察される応答よりも高く、このことは特定のT細胞免疫の障害は、HBV感染よりもより少ないことを示唆する。しかし、HCV患者におけるCTL応答の規模は、上手くHBV感染をクリアしたHBV感染個体で観察される規模よりも低い。これらの結果は、HCV感染患者が能動的な免疫治療に応答可能であるという理解を支持し、そして、HCVに対するT細胞の応答の相乗作用および増加は、慢性的なHCV感染の治療および予防において有用であり得る(Prince, A. M. FEMS Micro. Rev. 14:273, 1994)。

【0232】

いくつかの集団が、疾患抵抗性および病原性におけるHCV特異的なCTL応答の潜在的役割を分析してきた。いくつかの研究において、個々のHCVエピトープについてCTLウイルス血症とCTL前駆体頻度との間の相関関係は全く見出されなかった(Rehermannら、J. Clin. Invest. 98:1432-1440, 1996; Wongら、J. Immunol. 160:1479-1488, 1998)。しかし、他の研究では、多数のCTLエピトープに対するグローバル応答を考慮するという条件で、HCV感染のレベルとCTL応答との間の明白な相互関係が存在することが示唆された(Rehermannら、J. Virol. 70:7092-7102, 1996)。これらのデータは、保存されたHCV由来のエピトープの多重度に対する種々のCTL応答を含み得るワクチン構築物の開発について強い理論的根拠を示す。

【0233】

Kozzielらは、曝露されるがしかし血清陰性の個体において、HCV特異的なCTLの存在およびTヘルパー細胞応答を示してきた(Kozzielら、J. Infect. Diseases 176:859-866, 1997)。さらに、HCV特異的なCTLは、慢性的にHCV感染患者の健康な血清陰性の家族メンバーにおいて検出され、このことは防御免疫が、検出可能な感染の非存在下で、確立されていることを示す(Bronowickiら、J. Infect. Dis. 176:518-522, 1997; Scognamiglioら、準備中)。

【0234】

実験的な証拠はまた、HTLエпитープがHCV感染に対する免疫応答性および防御において重要な役割を果たすことを示す(Missaleら、J. Clin. Invest. 98:706-714, 1996)。Diepolderら(Lancet 346:1006, 1995)は、NS3遺伝子(NS3 1007-1534)の領域は、急性HCV感染をクリアする患者によって認識されるが、慢性的な感染を発症する患者によっては検出されないことを示す。続く研究は、この特定の領域が高度に交差反応性のHTLエпитープ(NS3 1248-1261)(そのエпитープは、試験された13DR分子の10に対して優れた親和性で結合する)を含むこと、そして、考慮される異なったHCV単離体の30/33において高度に保存されることを示した(Diepolderら、J. Virol. 71:6011-6019, 1997)。これらのデータは、この型のエпитープにHTL応答を指向すること(より交差反応性でないおよび/または高度に可変性のエпитープに対してではなく)は、治療および予防的に有益であり、そして、HCVワクチン構築物において類似した特徴を有するこのエпитープまたは他のエпитープを含むことについて強く主張する。

【0235】

以下の実施例は、ワクチン組成物に含むための免疫原性クラスIおよびクラスIIペプチドエпитープの同定、選択、および使用を例示する。

【0236】

(実施例1:HLAクラスIおよびクラスII結合アッセイ)

H L A分子に結合するペプチドの以下の実施例は、H L Aクラス Iおよびクラス IIペプチドの結合親和性の定量を示す。結合アッセイは、モチーフ保有であるかまたはモチーフ保有でないかのどちらかであるペプチドを使用して実施し得る。

【0237】

エプスタインバーウイルス (E B V) で形質転換したホモ結合性細胞株、線維芽細胞、C I R、または721.22形質転換体を、H L Aクラス I分子の供給源として使用する。M H Cクラス Iおよびクラス II分子の精製のために慣例的に使用される特定の細胞株を、表X X I Vに列挙する。開示されたプロトコル (S i d n e yら、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y 18, 3, 1 (1998); S i d n e yら、J. I m m u n o l. 154:247 (1995); S e t t eら、M o l. I m m u n o l. 31:813 (1994)) に従って、細胞溶解物を調製し、そして、H L A分子を精製した。H L A分子を、親和性クロマトグラフィーによって溶解物より精製した。その溶解物を適切な抗体に対して結合したセファロースC L-4 Bビーズのカラムを通過させた。細胞溶解物からH L Aの抽出のために使用した抗体を、表X X Vに列挙する。次いで、抗H L Aカラムを10mM T r i s-H C L、p H 8.0を含む1%NP-40、P B S、および0.4%n-オクチルグルコシドを含むP B Sで洗浄し、そして、H L A分子を、50mMジエチルアミン含有0.15M N a C l (0.4%n-オクチルグルコシド含有) (p H 11.5) を使用して溶解した。2.0M T r i s、p H 6.8の1/25容量を溶出に加え、p Hを約8.0に低下させた。次いで、溶出物をC e n t r i p r e p 3000コンソントレータ (A m i c o n, B e v e r l y, M A) で、遠心によって遠心分離した。タンパク質含量を、B C Aタンパク質アッセイ (P i e r c e C h e m i c a l C o., R i c k f o r d, I L) によって評価し、そして、S D S-P A G Eによって確認した。

【0238】

クラス Iおよびクラス II M H Cへのペプチドの結合を測定するために利用されるプロトコルの詳細な記載は、公開されている (S e t t eら、M o l. I

mmunol. 31:813, 1994; Sidneyら, Current Protocols in Immunology, Margulies, Ed., John Wiley & Sons, New York, Section 18.3, 1998)。手短には、精製されたMHC分子(5~500 nM)を、プロテアーゼインヒビター反応溶液の存在下で、0.05% Nonidet P-40 (NP40)を含むPBS (またはH-2 IAアッセイのための20% w/v ジギトニン) 中で48時間、種々の未標識ペプチドインヒビターおよび $1 \sim 10 \text{ nM}^{125}\text{I}$ 放射性標識プローブペプチドとインキュベートした。DRB1*0301 (それは、pH4.5で行なった) ならびにDRB1*1601 (DR2w21 β_1) およびDRB4*0101 (DRw53) (それはpH5.0で実施した)を除き、全てのアッセイをpH7.0で行なった。

【0239】

インキュベーション後、MHC-ペプチド複合体を7.8mm×15cmのTSK200カラム (TosoHaas 16215, Montgomeryville, PA) 上のゲルろ過によって、遊離ペプチドから分離した。DRB1*1501 (DR2w21 β_1) アッセイに使用された大きなサイズの放射性標識ペプチドは、このような条件下で未結合ピークから結合ピークを分離することがより難しいので、全てのDRB1*1501 (DR2w21 β_1) アッセイを、0.6mls/分で溶出する7.8mm×30cm TSK2000カラムを用いて実施した。TSKカラムからの溶出液を、Beckman170放射性標識検出器を通過させ、そして、放射活性をプロットしそしてHewlett-Packard3396Aインテグレーターを用いて積算し、そして結合したペプチドの画分を決定した。

【0240】

放射性標識ペプチドを、クロラミンT法を用いてヨウ素化した。それぞれのアッセイおよびそのアッセイ特異的IC₅₀ nMにおいて利用される代表的な放射性標識プローブペプチドを、表IVおよびVに要約した。代表的には、予備実験において、MHC調製物の各々を、総放射活性の10~20%と結合するための必要なHLA分子の濃度を決定するために、固定量の放射性標識ペプチドの存在下

で測定した。続く全ての阻害および直接的結合アッセイを、これらのHLA濃度で行なった。

【0241】

これらの条件 [標識] < [HLA] および [IC₅₀] ≥ [HLA] 下で、測定したIC₅₀値は、真のK_d値の合理的な近似値であった。ペプチドインヒビターは、代表的には、120 μg/ml から1.2 ng/ml までの範囲の濃度で試験し、そして、2~4の完全に独立した実験で試験した。異なった実験で獲得されたデータの比較を可能にするために、試験されたそれぞれのペプチドについてのIC₅₀で、阻害についてのポジティブコントロール（代表的には、放射性標識グロブペプチドの未標識バージョン）のIC₅₀を割ることによって、それぞれのペプチドについて相対的な結合数値を計算する。データベース目的および実験間比較のために、相対結合値を編集した。これらの値は、目的のペプチドの相対結合で、阻害についてのポジティブコントロールのIC₅₀ nMを割ることによって、IC₅₀ nM値に引き続き変換し得る。データ編集のこの方法は最も正確であり、そして異なった日数で試験されたペプチドまたは異なったロットの精製MHCとの比較について一貫していることを証明する。

【0242】

HLA-DR精製 (LB3.1) について使用される抗体は、α鎖特異的であるため、β₂分子は、β₃（およびまたはβ₄およびβ₅）分子から分離されない。結合アッセイのβ₁特異性は、DRB1*0101 (DR1)、DRB1*0802 (DR8w2)、およびDRB1*0803 (DR8w3) の場合で明らかであるが、β₃は全く発現されない。DRB1*0301 (DR3) およびDRB3*0101 (DR52a)、DRB1*0401 (DR4w4)、DRB1*0404 (DR4w14)、DRB1*0405 (DR4w15)、DRB1*1101 (DR5)、DRB1*1201 (DR5w12)、DRB1*1302 (DR6w19) およびDRB1*0701 (DR7) についてもまた示されてきた。DRB1*1501 (DR2w2β₁)、DRB5*0101 (DR2w2β₂)、DRB1*1601 (DR2w21β₁)、DRB5*0201 (DR51Dw21)、およびDRB4*0101 (DRw53) アッセイについてのβ鎖特異性

の問題は、線維芽細胞の使用によって回避できる。DR β 分子特異性に関するアッセイの開発および確証は、以前に記載されている（例えば、Southwoodら、J. Immunol. 160:3363-3373, 1998を参照のこと）。

【0243】

上記に概略される結合アッセイを、例えば、実施例2に記載されるように、スーパーモチーフおよび／またはモチーフ保有エピトープを分析するために使用し得る。

【0244】

（実施例2．保存されたHLAスーパーモチーフ保有CTL候補エピトープおよびモチーフ保有CTL候補エピトープの同定）

本発明のワクチン組成物は、広範な集団の適用範囲を達成するために、多数のHLAスーパーモチーフまたはモチーフを含む多数のエピトープを含み得る。この実施例は、そのようなワクチン組成物における封入についてのスーパーモチーフ保有エピトープおよびモチーフ保有エピトープの同定を例示する。集団適用範囲の計算を、以下に記載されるストラテジーを用いて実施した。

【0245】

（スーパーモチーフおよび／またはモチーフ保有エピトープの同定のためのコンピュータサーチおよびアルゴリズム）

HLAクラスIのスーパーモチーフもしくはモチーフまたはHLAクラスIIのスーパーモチーフもしくはモチーフを保有するエピトープについてのコンピュータサーチを、以下に行なった。全ての翻訳されたHCV単離配列を、適切なHLA結合モチーフを含む潜在的ペプチド配列を同定するために、テキストストリング（text string）サーチソフトウェアプログラム（例えば、MotifSearch1.4（D. Brown, San Diego））を用いて分析した；代替のプログラムは、本明細書中に開示されるモチーフ／スーパーモチーフを参照して、当該分野の情報に従って、容易に作製される。さらに、そのような計算は、頭の中で行なわれ得る。同定されたA2スーパーモチーフ配列、A3スーパーモチーフ配列、およびDRスーパーモチーフ配列を、特定

のHLAクラスI分子またはHLAクラスII分子に結合するそれらの能力を推定するための多項式アルゴリズムを用いて、スコアリングした。これらの多項式アルゴリズムは、伸長したモチーフおよび精製されたモチーフの両方を考慮し（すなわち、異なる位置での異なるアミノ酸の影響を考慮するために）、かつ以下の前提に基本的に基づく。この前提とは、ペプチドHLA分子相互作用の親和性全体（言い換えると ΔG ）は、以下の型の直線的な多項式関数：

$$[\Delta G] = a_{1i} \times a_{2i} \times a_{3i} \dots \times a_{ni}$$

として近似し得、ここで、 a_{ji} は、 n アミノ酸のペプチドの配列に沿って、所定の位置（ i ）での所定のアミノ酸（ j ）の存在効果を示す係数である。この方法の重要な仮説は、それぞれの位置での効果が互いに実質的に独立している（すなわち、個々の側鎖の独立した結合）ということである。残基 j がペプチド中の位置 i で生じる場合、定常量 j_i が、ペプチドの残りの配列とは無関係なペプチドの結合の自由エネルギーに貢献することが想定される。この仮説は、ペプチドが実質的に伸長したコンフォメーションでMHCに結合しかつT細胞によって認識されることを示す本発明者らの研究室の研究（データは本明細書中に示されていない）によって正当化される。

【0246】

特定のアミノ酸配列の誘導法は、Gulukotaraら、J. Mol. Biol. 267:1258-126, 1997; (Sidneyら、Human Immunol. 45:79-93, 1996; およびSouthwoodら、J. Immunol. 160:3363-3373, 1998もまた参照のこと)に記載されている。手短には、全ての i 位置について、アンカーおよび非アンカーも同様に、 j を有する全てのペプチドの平均相対結合(ARB)の相乗平均を、集団の残りと比較して計算し、そして、 j_i の推定値として使用した。クラスIIペプチドについて、多数のアライメントが可能な場合、反復手順に従って、最高のスコアリングのアライメントのみを利用した。試験セットにおける所定のポリペプチドのアルゴリズムスコアを計算するために、そのペプチドの配列に対応するARB値を乗算した。この積が選択される閾値を超える場合、そのペプチドは、結合することが推定される。適切な閾値を、所望される推定のストリン

ジェンシーの度合いの関数として選択する。

【0247】

(HLA-A2スーパータイプ交差反応性ペプチドの選択)

14のHCV単離体由来の完全ポリタンパク質配列をアライメントし、次いで、HLA-A2スーパーモチーフの一次アンカー特異性を含む保存された9および10マーの配列を同定するために、モチーフ同定ソフトウェアを利用して、走査した。

【0248】

全231の保存されたHLA-A2スーパーモチーフ陽性配列を同定した。次いで、これらのペプチドを、A*0201特異的多項式アルゴリズムを用いてA*0201の好ましい二次アンカー残基の存在について評価した。全67の保存されたモチーフ保有配列およびアルゴリズム陽性配列を同定した。

【0249】

これらの保存されたモチーフ保有9または10マーのペプチドのうち50を、精製したHLA-A*0201分子にインビトロで結合するそれらの能力について試験した(HLA-A*0201は、表現型A2スーパータイプ分子と考えられる)。50~500nMの範囲で、16ペプチドが500nM以下のIC₅₀値でA*0201と結合し、4ペプチドが高い結合親和性を有し(50nM以下のIC₅₀値)および12ペプチドが中間の結合親和性を有した(表XXVI)。

【0250】

次いで、これらの16ペプチドは、さらなるA2スーパータイプ分子(A*0202、A*0203、A*0206、およびA*6802)への結合について試験した。表XXVIに示されるように、これらのペプチドの多くは、A2スーパータイプ交差反応性結合因子であることを検出した。より特定には、16ペプチドのうち12(75%)が、試験された5つのA2スーパータイプ分子の少なくとも3つに結合した。

【0251】

(HLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープの選択)

上記に走査された同じ14の公知のHCV単離体由来の配列をまた、HLA-

A3スーパーモチーフの一次アンカーを使用して、保存されたペプチドの存在について試験した。全71の保存された9または10マーのモチーフ保有配列を同定した。A03アルゴリズムおよびA11アルゴリズムを用いたさらなる分析（例えば、Gulukotaら、J. Mol. Biol. 267:1258-1267, 1997およびSidneyら、Human Immunol. 45:79-93, 1996を参照のこと）は、アルゴリズムのどちらかまたは両方で高スコアである39配列を同定した。39ペプチド中の27を合成し、かつ2つの最も一般的なA3スーパータイプ分子であるHLA-A*03およびHLA-A*11への結合を試験した。500 nM以下の結合親和性で、A3および/またはA11と結合した15ペプチドを同定した（表XXVII）。次いで、これらのペプチドを、他の一般的なA3スーパータイプ対立遺伝子（A*3101、A*3301、およびA*6801）に対する結合交差反応性について試験した。15ペプチドのうちの7つが、試験された5つのHLA-A3スーパータイプ分子の少なくとも3つに結合した。

【0252】

独立した一連の実験の過程で（Kubora、J. Immunol. 152:3913-3924, 1994）、1つのペプチド（HCV NS53 1262）（上記で利用された選択規準によって同定されない、なぜならA3スーパーモチーフの一次アンカー特異性を有さないからである）が、A*03、A*11、およびA*68021と結合しA3スーパータイプにおいて交差反応性であると決定した。このペプチドはまた、表XXVIIに示す。興味深いことに、このペプチドは、ペプチド1073.14の単一の残基のN末端欠失を示す（これもまた、表XXVIIに示す）。

【0253】

要約すると、HCVゲノムの保存領域に由来する3以上のA3スーパータイプ分子に結合する8ペプチドを同定した。

【0254】

（HLA-B7スーパーモチーフ保有エピトープの選択）

同じ14のHCV単離体をまた、HLA-B7スーパーモチーフを有する保存

された9または10マーのペプチドの存在について試験した場合、35の配列が同定された。対応するペプチドを合成し、そして、最も一般的なB7スーパータイプ対立遺伝子（すなわち、B7スーパータイプ対立遺伝子体の原型）であるHLA-B*0702に対する結合について試験した。13のペプチドが、500 nM以下のIC₅₀でB*0702と結合した（表XXVII Ia）。次いで、これらの13のペプチドを、他の一般的なB7スーパータイプ分子（B*3501、B*51、B*5301、およびB*5401）への結合について試験した。表XXVII Iaに示されるように、1つのペプチド（コア169）のみが、試験された5つのB7スーパータイプ対立遺伝子体のうちの3つ以上に結合可能であった。

【0255】

さらなるB7スーパータイプエピトープを同定するために、さらなる研究を行った。上記で利用された14のHCV単離体由来のタンパク質配列を再び、保存されたモチーフ保有8および11マーを同定するために調査した。その単離体をまた、より低い保存性（51%～78%）を考慮に入れて9マーおよび10マー配列について調査した。25の8マー、16の11マー、および35の9および10マーを同定し、合成し、そして、B*0702への結合について試験した。13のペプチドが、高いまたは中間の親和性（500 nM以下のIC₅₀）で結合した（表XXVII Ib）。これらのペプチドを、他のB7スーパータイプ分子への結合についてさらにスクリーニングした。1つの交差反応性結合因子（NS3 1378 8マー（ペプチド29.0035/1260.04））のみが同定された（表XXVII Ib）。

【0256】

要約すると、全部で2つの交差反応性B7スーパーサブタイプ結合因子が同定された（スコア169およびNS3 1378）。

【0257】

（A1およびA24モチーフ保有エピトープの選択）

集団適用範囲をさらに増加するために、HLA-A1およびHLA-A24エピトープもまた、潜在的なワクチン構築物中に組み込み得る。

【0258】

以前の分析においては、2つのA1および3つのA24結合因子(HCVの4つの系統間で100%保存されている)が同定された(Wentworthら、Int. Immunol. 8:651-659, 1996)。上記で利用された14のHCV系統由来のタンパク質配列データの分析は、これらのペプチドが、79%を超えて保存されることを示し、そしてまた、さらなる11のA1モチーフ保有保存配列および25のA24モチーフ保有保存配列を同定した(表XXIX AおよびBを参照のこと)。このさらなる11のA1ペプチドのうちの8つおよびさらなる25のA24ペプチドのうち7つを、適切なHLA分子(すなわちA1またはA24)への結合について試験した。全体としては、表XXIXに示されるように、4つのA1モチーフペプチド(A)および3つのA24モチーフペプチド(B)は、適切な対立遺伝子体特異的HLA分子について500 nMまたはそれ未満の結合能力を有することが見出された。

【0259】

上記同定されたHLA-A2およびA3スーパーモチーフ保有エピトープの分析は、14のうち13の場合において、100 nM未満のIC₅₀で、スーパータイプ原型HLA分子(すなわち、A2スーパータイプについてはA*0201、およびA3スーパータイプについてはA*0301)と結合するペプチドが、交差反応性であり、そして続く実施例3に記載されるように、HCV感染患者によっておよび認識されることを明らかにした。これらの観察に基づいて、2つのA1ペプチドおよび1つのA24ペプチドエピトープをまた、ワクチン組成物中の封入のための化合物として選択した；これらのペプチドは、100 nM未満のIC₅₀で、適切なHLA分子と結合する。

【0260】

(実施例3：免疫原性の確認)

(A*0201免疫原性の評価)

A*0201/K^bトランスジェニックマウスで誘導されるCTLは、ヒトの系で誘導されるCTLに類似した特異性を示すことが示されている(例えば、Vitielloら、J. Exp. Med. 173:1007-1015, 1991

;Wentworthら、Eur. J. Immunol. 26:97-101, 1996を参照のこと)。従って、これらのマウスを、上記の実施例2で同定された12の保存されたA2スーパータイプ交差反応ペプチドの免疫原性を評価するために使用した。

【0261】

ペプチド免疫化に続くトランスジェニックマウスにおいてのCTL誘導が記載されている(Vitielloら、J. Exp. Med. 173:1007-1015, 1991; Alexanderら、J. Immunol. 159:4753-4761, 1997)。これらの研究において、マウスに、過剰のIA^b制限ヘルパーペプチド(140 μ g/マウス)(HBVコア128-140, Setteら、J. Immunol. 153:5586-5592, 1994)の存在下でIFA中に乳化したそれぞれのペプチド(50 μ g/マウス)を、しっぽの基部で皮下注射した。注射の11日後、脾細胞を、ペプチド負荷した同質遺伝子伝子的なLPS芽細胞の存在下でインキュベートした。6日後、培養物をペプチドパルス化標的を用いて、細胞傷害性活性についてアッセイした。表XXXに要約したデータは、12ペプチド中の7が(58%)、A*0201/K^bトランスジェニックマウスにおいて一次CTL応答を誘導できたことを示す。(これらの研究について、ペプチドは、それがCTLを誘導した場合、陽性であるとみなした(少なくとも2つのトランスジェニック動物において、L. U. 30/10⁶細胞が2以上(Wentworthら、Eur. J. Immunol. 26:97-101, 1996)))。

【0262】

保存された交差反応性候補CTLエピトープをまた、HCV感染患者から獲得したPBMCによるインビトロでの認識について試験した。手短には、HCVに感染した患者由来のPBMCを、10 μ g/mlの合成ペプチド存在下で培養した。7および14日後、その培養物をペプチドで再刺激した。その培養物を、標準の4時間⁵¹Cr放出アッセイで、特定のペプチドを使用してパルス化した標的細胞を用いて、21日目に、細胞溶解性活性についてアッセイした。そのデータを表XXXに要約する。示されるように、12のペプチドは全て、HCV感染の

患者由来のPBMCによって認識されるCTLエピトープである。表XXXのデータから、HLAトランスジェニックが、リコール応答において陽性であったいくつかのペプチドの免疫原性を十分に示さなかったことに興味深く留意される。この見かけ上の矛盾は、利用される免疫化経路（例えば、ペプチド免疫化に対する自然感染）またはCTLレパートリーにおける差異を反映し得る。

【0263】

(A*03/A11免疫原性の評価)

上記実施例2で同定された8つのA3スーパータイプ交差反応性ペプチドのうち6つの免疫原性を、HLA-A2トランスジェニックマウスについて上記に記載したプロトコル（Alexanderら、J. Immunol. 159:4753-4761, 1997）を使用して、HLA-A11/K^bトランスジェニックマウスにおいて評価した。これらの6つのペプチドのうち5つが、一次CTL応答を誘導し得た（表XXXI）。

【0264】

8つのペプチドの全てをまた、HCV感染患者およびそのような患者の接触者由来のPBMC培養物を用いて、共同研究者によって研究した。このデータをまた表XXXIに要約する。手短には、8つのペプチドの全てが、HCV感染個体によって認識した。

【0265】

(B7免疫原性の評価)

2つのB7スーパータイプ交差反応性ペプチドのうちの1つ（1145, 12、コア169）が、HCV感染患者における免疫原性について評価した。2人の別々の研究者が、このペプチドが、確かに免疫原性であり、そして、HCV感染患者由来のT細胞によって認識されることを示した（Changら、J. Immunol. 162:1156-1164, 1999）。

【0266】

（実施例4：アナログを作製することによって天然のエピトープの結合能力を改善するための伸長したスーパーモチーフの実施）

本明細書中に示されるように、HLAモチーフおよびスーパーモチーフ（一次

および／または二次の残基を含む)は、高度に交差反応性の天然のペプチドの同定および調製において有用である。さらに、HLAモチーフおよびスーパーモチーフの規定はまた、アナログ化、または「修正(fixed)されて」、そのペプチドに特定の特徴(例えば、スーパータイプを含むHLA分子の群内のより優れた交差反応性、および／またはそれらHLA分子のいくつかまたは全てについてのより優れた結合親和性)を与える天然のペプチド配列内の残基を同定することによって、当業者が高度に交差反応性のエピトープを操作するのを可能とする。調整された結合親和性を示すアナログペプチドの例を、この実施例に示す。

【0267】

(一次アンカー残基でのアナログ化)

実施例2に示すように、10を超える異なったHCV誘導のA2スーパータイプ制限エピトープが同定された。ペプチド操作ストラテジーを、試験したA2スーパータイプ対立遺伝子体の3/5に結合する、上記で同定した候補エピトープの交差反応性をさらに増加させるために、実行する。開示された(例えば、関連のおよび同時係属中のU.S. S. N. 09/226,775において)データに基づいて、A2スーパーモチーフ保有ペプチドの一次アンカーを、例えば、2位に好ましいL、I、V、またはMを導入するように、およびC末端にIまたはVを導入するように、変化させる。

【0268】

アナログペプチドの交差反応性を分析するために、各操作されたアナログを、プロトタイプのA2スーパータイプ対立遺伝子A*0201に対する結合について最初に試験し、次いで、A*0201結合能力を維持する場合、A2スーパータイプ交差反応性について試験する。

【0269】

同様に、エピトープを保有するHLA-A3スーパーモチーフのアナログもまた生成され得る。例えば、A3スーパータイプの分子の3/5に結合するペプチドを、位置2に好ましい残基(V、S、MまたはA)を保有するために一次アンカー残基において操作し得る。

【0270】

次いで、アナログペプチドを、 A^*03 および A^*11 （プロトタイプA3スーパータイプ対立遺伝子）を結合する能力について試験する。次いで、 500 nM 以下の結合能力を示すそれらのペプチドを、A3スーパータイプ交差反応性について試験する。

【0271】

A2モチーフ保有ペプチドおよびA3モチーフ保有ペプチドと同様に、3個以上のB7スーパータイプ対立遺伝子を結合するペプチドを、可能な場合、増加した交差反応結合を達成するために改善し得る。B7スーパーモチーフ保有ペプチドを、Sidneyら（J. Immunol. 157:3480-3490、1996）に示されるように、例えば、C末端の一次アンカー位置に好ましい残基（V、I、LまたはF）を保有するために操作し得る。

【0272】

（二次アンカー残基におけるアナログ）

さらに、HLAスーパーモチーフは、高い交差反応性のあるペプチドおよび／またはこのような特性と関連する二次アンカー位置の特定の残基を同定することにより、増加した親和性を有するHLA分子を結合するペプチドを操作することにおいて価値がある。これを示して、位置1における目立たない単一のアミノ酸置換を表すペプチドの結合能力を分析した。コア169配列の位置1のL～Fの置換を表すペプチド1145.13（表XXVII Ic）が、十分な親和性を有する全ての5つのB7スーパータイプ分子を結合し（全ての IC_{50} 値は、 132 nM 以下）、そして3つの場合において、35倍を超えるまで、親ペプチドの親和性より高い親和性を有する。

【0273】

これだけのB7スーパータイプ交差反応性エпитープを同定したことから、以前の結合評価からの本発明者らの結果を分析して、最低でも、弱い親和性（ $500\text{ nM} \sim 5\text{ }\mu\text{M}$ の IC_{50} ）を有する3/5のB7スーパータイプ分子を結合する、保存された（8、9、10、または11マー）ペプチドを同定するために分析した。この分析は、9個のペプチドを同定し、このうちの6個は、アナログである（analogued）（以前にアナログとされたコア169を含む）。これ

らのペプチドを、増強された結合親和性およびB7スーパータイプ交差反応性について試験する。

【0274】

十分に改善された結合能力または交差反応性を有する操作されたアナログを、例えば、IFA免疫またはリポペプチド免疫後に、HLA-B7トランスジェニックマウスにおける免疫原性について試験する。

【0275】

結論として、これらのデータは、単一のアミノ酸置換でさえその使用により、HLAスーパータイプ分子に対するペプチドリガンドの結合親和性および/または交差反応性を増加することが可能である。

【0276】

(実施例5：HLA-DR結合モチーフを有する保存されたHCV由来配列の同定)

HLAクラスIIスーパーモチーフまたはモチーフを保有するペプチドエпитーブをまた、実施例1～3に記載の方法論と類似の方法論を使用して、以下に概略を示すように、同定し得る。

【0277】

(HLA-DRスーパーモチーフ保有エпитーブの選択)

HCV由来、HLAクラスII HTLエпитーブを同定するために、HLAクラスIIスーパーモチーフ/モチーフ配列の同定のために使用される同じ14個のHCVポリタンパク質配列を、HLA-DRモチーフまたはスーパーモチーフ保有配列の存在について分析した。詳細には、DRスーパーモチーフを含む15マー配列を選択し、これはさらに9マーコア、および3個の残基N末端隣接領域およびC末端隣接領域をさらに含む(合計15個のアミノ酸)。15マー配列が、分析されたHCV系統の少なくとも79%(11/14)において保存されることもまた必要とされた。これらの基準により、合計49の非重複配列を同定し、これは、表XXIIAにおいて示される(クラスIIエпитーブの状況において、配列を、配列の80%より多くが、別のエпитーブと重複する場合、その配列は、操作上重複であるとみなす)。

【0278】

DR分子に結合するペプチドを予測するプロトコルを、開発した (Southwoodら, J. Immunol. 160:3363-3373, 1998)。個々のDR分子に特異的なこれらのプロトコルは、9マーコア領域のスコアリング (scoring) およびランキング可能にする。各々のプロトコルは、9マーコア内のDRスーパーモチーフ一次アンカー (すなわち、位置1および位置6) の存在についてペプチド配列をスコアリングするだけでなく、二次アンカーの存在について配列をさらに評価する。対立遺伝子特異的選択表を使用して (例えば, Southwoodら, ibidを参照のこと)、これらのプロトコルは、特定のDR分子に結合する高い可能性を有するペプチド配列を効率的に選択することを見出した。さらに、相前後してこれらのプロトコル (詳細には、DR1、DR4w4、およびDR7についてのプロトコル) を実施することにより、DR交差反応性ペプチドを効率的に選択し得ることを見出した。

【0279】

これらのプロトコルが、さらなるエピトープを同定するのに役立つかどうか調べるため、上記で使用される同じHCVポリタンパク質を、79%以上 (11/14系統) が保存されている9マーコア領域を有する15マーペプチドの存在について再スキャンした。これにより、152個の配列を同定し; このうちの49個が、上記のように、以前に同定された。次に、これらのペプチドの各々の9マーコア領域を、DR1、DR4w4、およびDR7アルゴリズムを使用して、スコアリングした。22のペプチド (12個の新しい配列を含む) (10個のペプチドが、49個の本来のセットに由来した) が、交差反応性DRバインダーを予測するプロトコル由来スコアを有する9マーコアを有することを見出した。12個のさらなる配列を、表XXXIIBにおいて示す。

【0280】

保存された、上記で同定されたHCV由来ペプチドを、種々の一般的なHLA-DR分子についてのそれらの結合能力について試験した。全てのペプチドを、一次パネル (DR1、DR4w4、およびDR7) においてDR分子に対する結合について試験した。次いで、これらの3個のDR分子の少なくとも2個を結合

するペプチドを、二次アッセイにおいてDR 2w 2 β 1、DR 2w 2 β 2、DR 6w 19、およびDR 9分子に対する結合について試験した。最終的に、4個の二次パネルDR分子の少なくとも2個、および従って累積的に、7個の異なるDR分子の少なくとも4個を、第3のアッセイにおいてDR 4w 15、DR 5w 11、およびDR 8w 2分子に対する結合についてスクリーニングした。一次、二次、および三次スクリーニングアッセイを含む10個のDR分子のうちの少なくとも7個に結合するペプチドを、交差反応性DRバインダーとみなした。これらのスクリーニングパネルの組成物、および関連する抗原の表現型の頻度を、表XXXIIIにおいて示す。

【0281】

試験の際に、本来の75個のペプチド(39%)のうちの29個が、2つ以上の一次HLA分子を結合したことを見出した。次いで、これらの交差反応性バインダーのうちの26個を、二次アッセイにおいて試験し、そして19個のペプチドを、一次および二次パネルにおける、7個のHLA-DR分子の少なくとも4個を結合することを見出した。最終的に、二次スクリーニング相を通過する19個のペプチドを、三次アッセイにおいて結合について試験した。結果として、10個の一般的なHLA-DR分子の少なくとも7個を結合する、9個のペプチドを同定した。表XXXIVは、一次～三次パネルにおいて、これら9個のペプチドおよび各対立遺伝子特異的HLA-DR分子に対するそれらの結合能力を示す。完全な結合分析を実施しなかった2個のペプチド(F134.05およびF134.08)もまた、表XXXIVにおいて示す。しかし、これらのペプチドの両方は、試験された7個のHLA-DR分子のうちの6個に結合した。F134.08は、ペプチド1283.44をネスト(nest)、これは、10個の対立遺伝子特異的HLA分子の8個を結合した。

【0282】

結論として、HCVゲノムの6個の別々の(すなわち、非重複)領域由来の11個の交差反応性DR結合ペプチドを、同定した。これらのエピトープが由来する6個の領域のうちの2個を、複数の重複エピトープにより包含する。

【0283】

(保存されたDR3モチーフペプチドの選択)

H L A-DR3が、白色人種集団、黒色人種集団、スペイン系人種集団において優勢な対立遺伝子であることから、DR3結合能力は、HTLエピトープの選択において重要な判定基準である。しかし、以前に得られたデータは、DR3のみまれに、他のDR対立遺伝子と交差反応性であることを示した(Sidneyら、J. Immunol. 149:2634-2640, 1992; Gelukら、J. Immunol. 152:5742-5748, 1994; Southwoodら、J. Immunol. 160:3363-3373, 1998)。これは、DR3ペプチド結合モチーフが、ほとんどの他のDR対立遺伝子の特異性とは異なるようであることにおいて、全く驚くべきでない。

【0284】

DR3を結合するペプチドを効率的に同定するために、標的タンパク質を、Gelukら(J. Immunol. 152:5742-5748, 1994)により報告される2個のDR3特異的結合モチーフの1つを保有する保存された配列について分析した。15個の配列(上記で同定されたDRスーパーモチーフ配列内にネストされたペプチド(ペプチドPape 22)を含む)を、同定した(表XXXXII d)。好ましくは、DR3モチーフを、DRスーパーモチーフ領域と近接してクラスター化されて見出される。

【0285】

DR3モチーフを含む15個のペプチドの14個を、それらのDR3結合能力について試験した。2個のペプチド(CH35.0106およびCH35.0107)が、 $1\mu\text{M}$ 以下(表XXXXV)の親和性を有してDR3を結合し、かつそれによってHLAクラスIIの高い親和性バインダーとして見なされることを見出した。

【0286】

次いで、この様式において同定されるDR3結合エピトープを、DRスーパーモチーフ保有ペプチドエピトープを有するワクチン組成物に含み得る。

【0287】

(実施例6:候補HCV由来HTLエピトープの免疫原性および既知の優性H

CV HTLエпитープ)

G. PapeおよびC. Ferrariとの共同研究の過程で、8個の保存されたHCV由来エピトープが同定され、このエピトープは、HCV感染個体により認識される。

【0288】

これらの研究の1つ(Diepolderら、J. Virol. 71:6011-6019, 1997)により、ペプチドF98.05(これは、NS3タンパク質の残基1248~1261にわたる)を、急性C型肝炎感染を有する4/5の患者からの14/23のNS3特異的CD4+T細胞クローンにより認識された、免疫優性のCD4+T細胞エピトープとして同定した。HLA-DR交差反応性バインダーであると上記に示されるこのエピトープ(表XXXXIVを参照のこと)を、複数のHLA分子(DR4、DR11、DR12、DR13、およびDR16)によりヘルパーCD4+T細胞に提示することが可能であった。より限定された状況で、相応じて、2個の他のペプチド(Pape 22およびPape 29)のどちらもDR交差反応性バインダーではないが、これらのペプチドもまた、CD4+T細胞クローンにより認識された。

【0289】

直接的な末梢血T細胞刺激により、およびHCV特異的T細胞株およびクローンの精密な特異性分析により、Ferrariのグループとの共同研究においてなされた研究は、6個の免疫優性エピトープ(Pape共同研究において同定されたものもまた1つ含む)を同定し、これらは、コアタンパク質、NS3タンパク質、およびNS4タンパク質の保存された領域由来である。これらのエピトープがまた、交差反応性であることを見出し、異なるクラスII分子の状況において、T細胞に提示された。この6個のエピトープのうちの3つ(F98.04(F134.03)、F134.05およびF134.08)は、交差反応性のHLA-DRバインダーである(表XXXXIVを参照のこと)。

【0290】

結論として、HCVゲノムの保存された領域由来の8個のエピトープの免疫原性を示した。これらのエピトープの3つ(F98.05、F134.05、およ

びF134.08;表XXIVを参照のこと)は、広範な交差反応性HLA-DR結合ペプチドである。

【0291】

(実施例7. 集団の適用範囲の広さを決定するための種々の人種背景におけるHLAスーパータイプの表現型の頻度の算出)

この実施例は、複数のスーパーモチーフおよび/またはモチーフを含む複数のエピトープを構成するワクチン組成物の集団の適用範囲の広さの評価を例証する。

【0292】

集団の適用範囲を分析するために、HLA対立遺伝子の遺伝子頻度を、決定した。各HLA対立遺伝子についての遺伝子頻度を、二項分布式 $gf = 1 - (SQR T(1 - af))$ を利用して、抗原または対立遺伝子頻度から算出した(例えば、Sidneyら、Human Immunol. 45:79-93, 1996を参照のこと)。全体的な表現型頻度を得るために、蓄積(cumulative)遺伝子頻度を算出し、そして蓄積抗原頻度は、逆の式 $[af = 1 - (1 - Cgf)^2]$ の使用により、導かれる。

【0293】

頻度データが、DNAタイピングのレベルにおいて利用可能でない場合、血清学的に規定される抗原頻度への対応が、仮定された。合計の潜在的なスーパータイプ集団の適用を得るために、結合の不安定性を仮定せず、そしてスーパータイプの各々に属することが確認された対立遺伝子のみを含んだ(最小の評価)。遺伝子座中の組み合わせにより達成される合計の潜在的適用の評価を、考えられるB対立遺伝子により含まれることが期待され得るAに含まれない集団の比率をAの適用に足すことにより行った(例えば、合計 $= A + B^*(1 - A)$)。A3様スーパータイプの確認されたメンバーは、A3、A11、A31、A*3301、およびA*6801である。A3様スーパータイプはまた、A34、A66、およびA*7401を含み得るが、これらの対立遺伝子を、全体の頻度の算出には含まなかった。同様に、A2様スーパータイプファミリーの確認されたメンバーは、A*0201、A*0202、A*0203、A*0204、A*0205、

A^{*}0206、A^{*}0207、A^{*}6802、およびA^{*}6901である。最終的に、B7様スーパータイプの確認された対立遺伝子は、B7、B^{*}3501-03、B^{*}51、B^{*}5301、B^{*}5401、B^{*}5501-2、B^{*}5601、B^{*}6701、およびB^{*}7801である（潜在的にはまた、B^{*}1401、B^{*}3504-06、B^{*}4201、およびB^{*}5602）。

【0294】

A2スーパータイプ、A3スーパータイプおよびB7スーパータイプを組み合わせることにより達成される集団適用範囲は、5つの主要な人種集団において約86%である（表XXIを参照のこと）。適用範囲を、A1モチーフおよびA24モチーフを保有するペプチドを含むことにより拡大し得る。5つの異なる主要な人種集団を越え、平均して、A1は、集団の12%そしてA24は、集団の29%で存在する（白色人種、北米黒色人種、中国人、日本人、およびスペイン系人種）。合わせて、これらの対立遺伝子は、これらの同じ人種集団において平均39%の頻度で示された。主要な人種を越えた合計の適用範囲は、A1およびA24が、A2スーパータイプ対立遺伝子、A3スーパータイプ対立遺伝子およびB7スーパータイプ対立遺伝子の適用と組み合わせる場合、95%より大きい。類似のアプローチを使用して、クラスIIモチーフ保有エピトープの組み合わせを用いて達成された集団適用を評価し得る。

【0295】

（候補HLAクラスIエピトープおよびクラスIIエピトープの要約）

要約すれば、上記の実施例において示されるデータに基づき、HCVウイルスの保存された領域由来の26個のCTL候補ペプチドエピトープを同定した（表XXV Ia）。これらとしては、12個のHLA-A2スーパーモチーフ保有エピトープ、8個のHLA-A3スーパーモチーフ保有エピトープ、および1個のHLA-B7スーパーモチーフ保有エピトープが挙げられ、この各々は、複数のA2スーパータイプ分子、A3スーパータイプ分子、またはB7スーパータイプ分子に結合可能であり、そしてHLAトランスジェニックマウスにおいて免疫原性であるかまたはヒトPBLに対して抗原性である（ペプチド29.0035/1260.04を例外として）。免疫原性について評価されないさらなるエピ

トープもまた挙げられる。それらは、さらなるB7スーパータイプ保有エピトープ、および2個のHLA-A1および1個のHLA-A24の高い親和性結合ペプチドである。HLA-A33もまた結合する、公知のHLA-A31に制限されたエピトープ(VGIYLLPNR)もまた、表XXXVIaに示され、そして他のクラスIエピトープまたはクラスIIエピトープと組み合わせて有用である。

【0296】

これらの26個のCTLエピトープ(本明細書中および当該分野で開示されるように)と共に、平均の集団適用(すなわち、少なくとも1個のHCVエピトープの認識)が、5つの主要な人種集団の各々において95%より大きいことが予測される。これらのエピトープのうちの25個により付与される適用の潜在的重複(ペプチド24, 0086を含まなかった)を、ゲーム理論モンテカルロシミュレーション分析を使用して推定し、これは、当該分野で公知である(例えば、Osborne, M. J. およびRubinstein, A. 「A course in game theory」MIT Press, 1994を参照のこと)。図1において示されるように、白色人種集団、北米黒色人種集団、日本人種集団、中国人種集団、およびスペイン系人種集団から構成される集団の個体の90%が、本明細書中に記載される候補エピトープの2個以上を認識することが推定される。

【0297】

ミニ遺伝子構築物または他のワクチン処方物の設計における使用のための好ましいHCV由来HTLエピトープの表を、表XXXVIbに要約する。示されるように、複数のHLA-DR分子に結合するかまたはHLA-DR3を結合する、9個の異なるペプチド結合領域を、同定した(NS4 1914-1935領域の場合、患者により認識されるより長いペプチド(F134, 08)を、より短いペプチド(1283, 44)に関して選択した。より長いペプチドが、このより短いペプチドを本質的に取り込み、そしてまた、このより短いペプチドが結合しない、さらなるDR分子を結合する)。これらのペプチドのうちの3個を、HCV感染患者において優性エピトープとして認識した。

【0298】

DRスーパーモチーフ、およびDR3を認識する10個の一般的なDR分子の各々は、最小の2個のエピトープにより含まれることを推定する。相応じて、エピトープのこのパネルにより示される合計の推定される集団適用は、5つの主要な人種集団の各々において91%を越える(表XXXXVII)。

【0299】

(実施例8: プライミング後の内因的にプロセスされる抗原の生成の認識)

この実施例は、実施例1～6に記載されるように同定されかつ選択されたネイティブなペプチドエピトープまたは類似のペプチドエピトープにより誘導されるCTLが、内因的に合成される、すなわちネイティブな抗原を認識することを決定する。

【0300】

実施例3におけるようなペプチドエピトープ(例えば、HLA-A2スーパーモチーフ保有エピトープ)を用いて免疫されたトランスジェニックマウスから単離されたエフェクター細胞を、ペプチドでコートされた刺激細胞を使用してインビトロで再刺激する。6日後、エフェクター細胞を、細胞傷害性についてアッセイし、そしてペプチド特異的細胞傷害性活性を含む細胞株をさらに再刺激する。さらに6日後、これらの細胞株を、ペプチドの非存在下または存在下で、 ^{51}Cr 標識Jurkat-A2.1/K^b標的細胞に関する細胞傷害性活性について試験し、そしてまた、内因的に合成された抗原を保有する ^{51}Cr 標識細胞(すなわち、HCV発現ベクターを用いて安定にトランスフェクトされる細胞)に関して試験する。

【0301】

この結果は、ペプチドエピトープを用いてブライムされた動物から得られたCTL系統が、内因的に合成されたHCV抗原を認識することを示す。このような分析に使用されるトランスジェニックマウスモデルの選択は、評価されているエピトープに依存する。HLA-A*0201/K^bトランスジェニックマウスに加え、いくつかの他のトランスジェニックマウスモデル(ヒトA11を有するマウスを含む)(これはまた、A3エピトープ、およびB7対立遺伝子を評価するた

めに使用され得る)が特徴付けられており、そして他(例えば、HLA-A1およびA24に対するトランスジェニックマウス)が開発されている。HLA-DR1マウスモデルおよびHLA-DR3マウスモデルもまた開発されており、これを、HTLエпитープを評価するために使用し得る。

【0302】

(実施例9：トランスジェニックマウスにおけるCTL-HTL結合体化エイトープの活性)

本実施例は、HCV CTL/HTLペプチド結合体の使用(これにより、ワクチン組成物が、HCV感染患者またはHCVの危険のある個体に投与されるペプチドを含む)によるトランスジェニックマウスにおけるCTLおよびHTLの誘導を例示する。ペプチド組成物は、複数のCTLおよび/またはHTLエイトープを含み得る。この分析は、ワクチン組成物における1つ以上のHTLエイトープの含有により達成され得る増強された免疫原性を示す。このようなペプチド組成物は、好ましいCTLエイトープ(例えば、表XXVI-XXIXから選択される少なくとも1つのCTLエイトープ、またはそのエイトープのアナログを含む)に結合体化される脂質化された(lipidated)HTLエイトープを含み得る。このHTLエイトープを、例えば、表XXXIから選択する。

【0303】

リボペプチド調製：リボペプチドを、適切な脂肪酸を、樹脂結合ペプチドのアミノ末端にカップリングすることにより調製する。代表的な手順は、以下のようである：4倍過剰の、適切な脂肪酸の予め形成された対称無水物のジクロロメタン溶液を、その樹脂に添加し、この混合物を、2時間反応させる。この樹脂を、ジクロロメタンを用いて洗浄し、そして乾燥する。次いで、この樹脂を、適切なスカベンジャーの存在下で(例えば、5%(v/v)水)、60分間、20℃にて、トリフルオロ酢酸を用いて処理する。過剰のトリフルオロ酢酸のエバポレーション後、粗ペプチドを、ジエチルエーテルを用いて洗浄し、メタノール中で溶解し、そして水の添加により沈殿する。このペプチドを、濾過により回収し、そして乾燥する。

【0304】

免疫手順：トランスジェニックマウスの免疫を、記載されるように実施する（Alexanderら、J. Immunol. 159:4753-4761、1997）。例えば、ヒトHLA-A2.1対立遺伝子についてのトランスジェニックであり、そしてHLA-A*0201モチーフ保有エピトープまたはHLA-A2スーパーモチーフ保有エピトープの免疫原性アセスメントのために有用であるA2/K^bマウスを、生理食塩水、またはDMSO/生理食塩水中で処方される0.1mlのペプチド結合体を用いて皮下で（尾の基部）プライミングする。プライミングから7日後、これらの動物から得られる脾細胞を、ペプチドでコートされた、同族の照射されたLPSで活性化されたリンパ芽球を用いて再刺激する。

【0305】

細胞株：ペプチド特異的細胞傷害性アッセイのための標的細胞は、HLA-A2.1/K^bキメラ遺伝子を用いてトランスフェクトされたJurkat細胞である（例えば、Vitellioら、J. Exp. Med. 173:1007、1991）。

【0306】

インビトロのCTL活性：プライムの1週間後、脾臓細胞（ 30×10^6 細胞/フラスコ）を、37℃、10mlの培養培地/T25フラスコ中で、同族の、照射された（3000ラド）、ペプチドコートされたリンパ芽球（ 10×10^6 細胞/フラスコ）と、共培養する。6日後、エフェクター細胞を回収し、細胞毒性活性についてアッセイする。

【0307】

細胞傷害性活性についてのアッセイ：標的細胞（ $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ ）を、37℃で、 $200 \mu\text{l}$ の ^{51}Cr の存在下でインキュベートする。60分後、細胞を3回洗浄し、そしてR10培地で再懸濁する。 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で必要とされるペプチドを添加する。アッセイについて、 10^4 ^{51}Cr 標識標的細胞を、Uボトム96ウェルプレートにおいて、異なる濃度のエフェクター細胞（ $200 \mu\text{l}$ の最終用量）に添加する。37℃のインキュベーション6時間後、上清の0.1mlのアリコート、各ウェルから除去し、そして放射活性を、マイク

ロメディック (micromedic) 自動 γ 計測器において計測する。百分率特異的溶解を、式により測定する：百分率特異的放出 = $100 \times (\text{実験的放出} - \text{自発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{自発的放出})$ 。同じ条件下の別個のCTLアッセイの実行の間で、比較を容易にするために、 $\%^{51}\text{Cr}$ 放出データを、溶解単位/ 10^6 個の細胞として表す。1つの溶解単位を、6時間 ^{51}Cr 放出アッセイにおいて10,000標的細胞の30%の溶解を達成するために必要とされるエフェクター細胞の数として任意に規定する。特異的な溶解単位/ 10^6 を得るために、ペプチドの非存在下で得られた溶解単位/ 10^6 を、ペプチドの存在下で得られた溶解単位/ 10^6 から引く。例えば、30%の ^{51}Cr 放出を、ペプチドの非存在下、50:1のエフェクター(E):標的(T)比(すなわち、10,000個の表TKEII標的に対して、 5×10^5 個のエフェクター細胞)において得て、そしてペプチドの存在下、5:1(すなわち、10,000個の標的に対して、 5×10^4 個のエフェクター細胞)において、特異的溶解単位は、 $[(1/50,000) - (1/500,000)] \times 10^6 = 18\text{LU}$ である。

【0308】

この結果を、免疫原性CTL/HTL結合体ワクチン沈殿物を注入された動物のCTL応答の大きさを評価するために、分析し、そして実施例3で概略されるようなCTLエピトープを使用して達成されるCTL応答の大きさと比較する。これと類似する分析を、複数のCTLエピトープおよび/または複数のHTLエピトープを含むペプチド結合体の免疫原性を評価するために実施し得る。これらの手順に従って、CTL応答を誘導し、そして付随して、HTL応答を、このような組成物の投与に際して誘導することを見出す。

【0309】

(実施例10. HCV特異的ワクチン中の含有のためのCTLエピトープおよびHTLエピトープの選択)

本実施例は、本発明のワクチン組成物のためのペプチドエピトープの選択についての手順を例示する。この組成物中のペプチドは、核酸配列の形態で、ペプチドをコードする単一または1つ以上の配列(すなわち、ミニ遺伝子)であり得るか、または単一のエピトープおよび/またはポリエピトープのペプチドであり得る。

る。

【0310】

投与の際に、腫瘍クリアランスと相互に関係があることが観察されている免疫応答を模倣するエピトープを選択する。例えば、ワクチンは、少なくとも1つのHCV抗原領域からとられる3～4個のエピトープを含み得る。1つの領域由来のエピトープを、1つ以上のさらなるHCV抗原領域由来のエピトープと組み合わせて、使用し得る。エピトープのアナログもまた、ワクチンにおける含有のために選択し得る。

【0311】

HCLクラスI分子に対する500nM以下のIC₅₀の結合親和性を有するか、またはクラスIIに対する1000nM以下のIC₅₀の結合親和性を有するエピトープを選択する。

【0312】

十分なスーパーモチーフ保有ペプチド、または対立遺伝子特異的モチーフ保有ペプチドの十分なアレイを、広範な集団の適用を与えるために選択する。例えば、エピトープを、少なくとも80%の集団適用を提供するために選択する。モンテカルロ分析（当該分野で公知の統計的評価）を使用して、集団適用の広さ、または重複を評価し得る。

【0313】

ポリエピトープの組成物（例えば、ミニ遺伝子）を作製する場合、代表的には、目的のエピトープを含む可能な最も小さいペプチドを生成することが所望される。この使用される原理は、ネストされるエピトープを含むペプチドを選択する場合に使用される原理と同じでない場合、類似する。さらに、しかし、ミニ遺伝子として提供される核酸配列の決定の際、それによりコードされるペプチド配列を、任意の「接合部エピトープ」が作製されているか否かを決定するために分析する。接合部エピトープは、予想されるように（例えば、モチーフ分析により）、潜在的なHLA結合エピトープである。接合部エピトープは、一般的に回避される。なぜなら、レシピエントは、HLA分子に結合し得、そしてそのエピトープに対する免疫応答を生成するからであり、これは、ネイティブなタンパク質配

列には存在しない。

【0314】

ワクチン組成物における含有のためのペプチドエピトープを、例えば、表XXVI～XXIXおよび表XXXIIに列挙されるエピトープから選択する。選択されたペプチドから構成されるワクチン組成物は、投与される場合、安全で、効果的であり、そして急性HCV感染を排除する免疫応答の大きさに類似の免疫応答を惹起する。

【0315】

(実施例11：ミニ遺伝子の複数のエピトープDNAプラスミドの構築)

この実施例は、ミニ遺伝子発現プラスミドの構築のための誘導を提供する。ミニ遺伝子プラスミドは、もちろん、本明細書中に記載されるようなCTLおよび/またはHTLエピトープもしくはエピトープのアナログの種々の構造を含み得る。発現プラスミドの構築および評価の例を、例えば、同時に係属しているU.S. S. N. 09/311, 784 (5/13/99に出願される)において記載する。HCVエピトープの発現のためのこのようなプラスミドの例を図2に示し、これは、ミニ遺伝子構築物におけるHCVペプチドエピトープの位置を例示する。

【0316】

ミニ遺伝子発現プラスミドは、複数のCTLペプチドエピトープおよびHTLペプチドエピトープを含み得る。本実施例において、HLA-A2スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-A3スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープ、HLA-B7スーパーモチーフ保有ペプチドエピトープならびにHLA-A1モチーフ保有ペプチドエピトープおよびHLA-A24モチーフ保有ペプチドエピトープを、DRスーパーモチーフ保有エピトープおよび/またはDR3エピトープと共に使用する(図2)。好ましいエピトープを、例えば、表XXVI～XXIXおよびXXXIIにおいて同定する。複数のHCV抗原(例えば、コア、NS4、NS3、NS5、NS1/E2)由来のHLAクラスIスーパーモチーフまたはモチーフ保有ペプチドエピトープを選択し、その結果、複数のスーパーモチーフ/モチーフを、広範な集団適用を保証するために示す。同様に、

H L A クラス I I エピトープを、複数の H C V 抗原から選択し、広範な集団適用を提供し、すなわち、H L A D R - 1 - 4 - 7 スーパーモチーフ保有エピトープおよび H L A D R - 3 モチーフ保有エピトープを、ミニ遺伝子構築物中の含有のために選択する。次いで、選択した C T L エピトープおよび H T L エピトープを、発現ベクターにおける発現のためにミニ遺伝子中に取り込む。

【0317】

本実施例は、このようなミニ遺伝子保有発現プラスミドの構築に使用される方法を示す。ミニ遺伝子組成物のために使用され得る他の発現ベクターが利用可能であり、そして当業者に公知である。

【0318】

ミニ遺伝子 DNA プラスミドは、コンセンサス K o z a k 配列ならびにコンセンサスマウス κ I g 軽鎖シグナル配列、続いて本明細書中に開示された原理に従って選択された C T L エピトープおよび／または H T L エピトープを含む。この配列は、p c D N A 3 . 1 M y c - H i s ベクターによってコードされた、M y c 抗体エピトープタグおよび H i s 抗体エピトープタグに融合されたオープンリーディングフレームをコードする。

【0319】

15個のヌクレオチド重複を含む平均約70ヌクレオチド長である重複オリゴヌクレオチド（例えば、8個のオリゴヌクレオチド）を、合成し、そしてHPLC精製する。このオリゴヌクレオチドは、選択されたペプチドエピトープならびに適切なリンカーヌクレオチド、K o z a k 配列、およびシグナル配列をコードする。最終的なマルチエピトープミニ遺伝子を、P C R を用いた3セットの反応で重複オリゴヌクレオチドを伸長することによってアセンブルする。P e r k i n / E l m e r 9600 P C R 機器を使用し、そして以下の条件を使用して全部で30サイクルを実施する：95℃で15分間、アニーリング温度（各プライマー対の最も低く計算されたT_mより5°下）で30秒間、および72℃で1分間。

【0320】

第1回目のP C R 反応について、2つのオリゴヌクレオチド（すなわち、増幅

プライマー対)の各々の5 μ gを、アニーリングし、そして伸長する：オリゴヌクレオチド1+2、3+4、5+6、および7+8を、Pfuポリメラーゼ緩衝液(1 \times =10mM KCL、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM Tris-クロライド、pH8.75、2mM MgSO₄、0.1% Triton X100、100 μ g/ml BSA)、0.25mM 各dNTP、および2.5UのPfuポリメラーゼを含む100 μ lの反応物と合わせる。全長ダイマー生成物を、ゲル精製し、そして、2つの反応物(1+2と3+4の生成物、ならびに5+6と7+8の生成物を含む)を混合し、アニーリングし、そして10サイクルで伸長させる。次いで、この2つの反応物の半分を混合し、そして、5サイクルのアニーリングおよび伸長を実施し、その後、隣接プライマーを添加して、全長生成物をさらに25回サイクルで増幅する。全長生成物を、ゲル精製し、そしてpCR-blunt (Invitrogen)にクローン化し、そして、個々のクローンを、配列決定によってスクリーニングする。

【0321】

(実施例12、プラスミド構築およびこの構築物が誘導する免疫原性の程度)

実施例11に概説された方法論を用いて調製されたプラスミド構築物が免疫原性を誘導し得る程度を、マウスへのインビボ注射ならびに引き続きCTL活性およびHTL活性のインビトロ評価(これらは、それぞれ、細胞傷害アッセイおよび増殖アッセイを用いて分析され、例えば、U. S. S. N. 09/311,784(1999年5月13日出願)およびAlexanderら、Immunity 1:751-761, 1994に詳述される)を介して評価する。例えば、HLA-A2スーパーモチーフエピトープを含むpMiniミニ遺伝子構築物がCTLをインビボで誘導する能力を評価するために、HLA-A2.1/K^bトランスジェニックマウスを、100 μ gの裸のcDNAを用いて筋内で免疫する。cDNA免疫によって誘導されたCTLのレベルを比較するための手段として、コントロール群の動物もまた、実際のペプチド組成物(これは、ミニ遺伝子によってコードされるのと同様に単一のポリペプチドとして合成される複数エピトープを含む)で免疫する。

【0322】

免疫動物からの脾細胞を、各それぞれの組成物（ミニ遺伝子にコードされるペプチドエピトープまたはポリエピトープペプチド）で2回刺激し、次いで、 ^{51}Cr 放出アッセイにおいてペプチド特異的細胞傷害活性についてアッセイする。この結果は、A3制限されたエピトープに対するCTL応答の大きさを示し、従って、ミニ遺伝子ワクチンおよびポリエピトープワクチンのインビボ免疫原性を示す。従って、このミニ遺伝子が、ポリエピトープペプチドワクチンと同様に、HLA-A2スーパーモチーフペプチドエピトープに対して指向される免疫応答を誘発することを見出した。同様の分析がまた、他のHLA-A3トランスジェニックマウスモデルおよびHLA-B7トランスジェニックマウスモデルを用いて実施され、HLA-A3モチーフおよびHLA-B7モチーフまたはHLA-A3スーパーモチーフおよびHLA-B7スーパーモチーフによるCTL誘導を評価する。

【0323】

ミニ遺伝子をコードするクラスIIエピトープがインビボでHTLを誘導する能力を評価するために、例えば、I-A^b制限されたマウスを、100 μg のプラスミドDNAを用いて筋肉で免疫する。DNA免疫によって誘導されたHTLのレベルを比較するために、コントロール群の動物をまた、完全フロイントアジュバント中にエマルジョン化された実際のペプチド組成物を用いて免疫する。

【0324】

CD4⁺ T細胞（すなわち、HTL）を、免疫動物の脾細胞から精製し、そして、各それぞれの組成物（ミニ遺伝子にコードされるペプチド）で刺激する。HTL応答を、 ^3H チミジン取り込み増殖アッセイを用いて測定する（例えば、Alexanderら、Immunity 1:751-761、1994を参照のこと）。この結果は、HTL応答の大きさを示し、従って、このミニ遺伝子のインビボでの免疫原性を示す。

【0325】

あるいは、プラスミド構築物は、エピトープ発現核酸構築物を用いたAPCの形質導入またはトランスフェクションに続く、APCによるエピトープ提示について試験することによって、インビトロで評価され得る。このような研究は、「

抗原性」を決定し、そして、ヒトAPCの使用を可能にする。このアッセイは、ある状況においてAPCによって提示されるこのエピトープの能力を示し、この状況は、細胞表面上のエピトープ-HLAクラスI複合体の密度を定量することによって、T細胞により認識される。定量を、APCから溶出されたペプチドの量を直接測定することによって実施し得るか（例えば、Sijtsら、J. Immunol. 156:683-692、1996; Demotzら、Nature 342:682-684、1989を参照のこと）；または、ペプチド-HLAクラスI複合体の数を、感染もしくはトランスフェクトされた標的細胞によって誘導された溶解物の量またはリンホカイン放出を測定し、次いで、等しいレベルの溶解物またはリンホカイン放出を得るのに必要であるペプチドの濃度を決定することによって概算され得る（例えば、Kageyamaら、J. Immunol. 154:567-576、1995を参照のこと）。

【0326】

（実施例13：予防的使用のためのペプチド組成物）

本発明のワクチン組成物を使用して、HCV感染の危険性がある人のHCV感染を予防する。例えば、実施例9および／または実施例10に選択されるような複数のCTLエピトープおよびHTLエピトープを含むポリエピトープペプチドのエピトープ組成物（またはこれを含む核酸）（これはまた、集団の80%より多くを標的化するように選択される）を、HCV感染の危険性がある個体に投与する。この組成物を、複数のエピトープを含む単一脂質性ポリペプチド（single lipidated polypeptide）として提供する。このワクチンを、フロイント不完全アジュバントからなる水性キャリア中で投与する。最初の免疫のためのペプチドの用量は、70kgの患者について、約1～約50,000μg、一般的に100～5,000μgである。ワクチンの最初の投与の後に、4週間でブースター用量が続き、PBMCサンプル中のエピトープ-特異的CTL集団の存在を決定する技術によるこの患者における免疫応答の大きさの評価が続く。さらなるブースター用量を、必要である場合、投与する。この組成物は、HCV感染に対する予防法として、安全かつ効果的の両方であることが見出される。

【0327】

あるいは、ポリエピトープペプチド組成物は、当該分野で公知の方法論および本明細書中に開示される方法論に従って、核酸として投与され得る。

【0328】

(実施例14：ネイティブなHCV配列由来のポリエピトープワクチン組成物)

ネイティブなHCVポリタンパク質配列を、好ましくは各クラスIおよび/またはクラスIIのスーパーモチーフまたはモチーフについて規定されたコンピューターアルゴリズムを用いてスクリーニングし、複数のエピトープを含むポリタンパク質の「相対的に短い (relatively short)」領域を同定する。そして、この配列は、好ましくは、ネイティブ抗原全体よりも短い長さである。複数の異なる（重複させている）エピトープを含むこの相対的に短い配列を選択し、そして使用して、ミニ遺伝子構築物を作製する。この構築物を操作して、ネイティブなタンパク質配列に対応するペプチドを発現させる。「相対的に短い」ペプチドは、一般的に、250アミノ酸長より短く、しばしば100アミノ酸長より短く、好ましくは75アミノ酸長より短く、そしてより好ましくは50アミノ酸長より短い。ワクチン組成物のタンパク質配列を選択する。なぜなら、この配列は、配列内に最大数のエピトープを含むからである（すなわち、この配列は、高いエピトープの集中を有する）。本明細書中で述べられるように、エピトープモチーフがネスト (be nested) されてもよいし、重複（すなわち、互いに関してフレームシフトする）であってもよい。例えば、フレームシフトした重複エピトープを有する、2つの9マーのエピトープおよび1つの10マーのエピトープは、10アミノ酸ペプチド中に存在し得る。このようなワクチン組成物を、治療目的または予防目的のために投与する。

【0329】

ワクチン組成物は、好ましくは、例えば、3つのCTLエピトープおよびHCV抗原由来の少なくとも1つのHTLエピトープを含む。このポリエピトープのネイティブな配列は、ペプチドとしてかまたはこのペプチドをコードする核酸配列としてかのいずれかで投与される。あるいは、アナログが、このネイティブな配

列から作製され得、これによって、1つ以上のエピトープは、ポリエピトープベプチドの交差反応性および／または結合親和性特性を変化させる置換を含む。

【0330】

本実施例の実施形態は、免疫系プロセッシングの今まで発見されていない局面が、ネイティブなネスト配列 (nested sequence) に適用され、これによって、治療的または予防的な免疫応答を誘導するワクチン組成物の生成を容易にする可能性を提供する。さらなるこのような実施形態は、現在未知であるHLA構造に関するモチーフ保有エピトープの可能性を提供する。さらに、本実施形態（アナログを欠く）は、複数のペプチド配列に対する免疫応答（これは、実際に、ネイティブなHCV抗原に存在する）を指向し、従って、任意の連結エピトープを評価する必要を回避する。最後に、本実施形態は、核酸ワクチン組成物を生成する場合における経済的な指標を提供する。

【0331】

本実施例に関連して、コンピュータプログラムは、当該分野における原理に従って導かれ得、これは、標的配列において、1つの配列長あたりの最も大きい数のエピトープを同定する。

【0332】

（実施例15．複数の疾患に指向されるポリエピトープワクチン組成物）

本発明のHCVペプチドエピトープを、1つ以上の他の疾患に関連する標的抗原由来のペプチドエピトープと共に使用し、HCVならびに1つ以上の他の疾患の、予防または処置に有用であるワクチン組成物を作製する。他の疾患の例としては、HIVおよびHBVが挙げられるが、これらに限定されない。

【0333】

例えば、複数のCTLエピトープおよびHTLEピトープを含むポリエピトープペプチド組成物（これは、集団の98%より多くを標的化する）は、HCV感染およびHIV感染の両方について危険性がある個体に投与するために作製され得る。この組成物は、種々の疾患関連供給源由来の複数のエピトープを組込む単一ポリペプチドとして提供され得るか、または1つ以上の別々のエピトープを含む組成物として投与され得る。

【0334】

(実施例16. 免疫応答を評価するためのペプチドの使用)

本発明のペプチドを使用して、前立腺癌関連抗原を指向する特定のCTL集団またはHTL集団の存在について、免疫応答を分析し得る。このような分析は、例えば、Oggら、Science 279:2103-2106、1998およびGretenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7568-7573、1998に記載されるようなマルチマー複合体を用いて実施され得る。以下の実施例において、本発明に従うペプチドを、免疫原としてではなく、診断目的または予防目的のための試薬として使用する。

【0335】

本実施例において、高度に感受性なヒト白血球抗原テトラマー複合体（「テトラマー」）を、例えば、横断的（cross-sectional）分析（例えば、疾患の異なる段階のHLA A*0201陽性個体由来のHCV HLA-A*0201特異的CTL頻度の分析、または引続く、A*0201モチーフを含むHCVペプチドを用いた免疫の分析）に使用する。テトラマー複合体を、記載されるように合成する（Museyら、N. Engl. J. Med. 337:1267、1997）。簡単に言うと、精製HLA重鎖（本実施例におけるA*0201）および β 2ミクロglobulinを、原核生物発現系的手段によって合成する。この重鎖を、膜貫通細胞質テイルの欠失およびBirA酵素ビオチン化部位を含む配列のCOOH末端添加によって改変する。重鎖、 β 2ミクロglobulin、およびペプチドを、希釈によって再度折り畳む。45 kDの再度折り畳まれた生成物を、高速タンパク質液体クロマトグラフィーによって単離し、次いで、ビオチン（Sigma、St. Louis、Missouri）、アデノシン5'三リン酸、およびマグネシウムの存在下で、BirAによってビオチン化する。ストレプトアビジン-フィコエリトリン結合体を、1:4のモル比で添加し、そして、テトラマー生成物を、1 mg/mlに希釈する。生じる生成物を、テトラマー-フィコエリトリンと呼ぶ。

【0336】

患者の血液サンプルの分析に関して、約100万個のPBMCを、300 gで

5分間遠心分離し、そして、 $50\mu\text{l}$ の冷リン酸緩衝化生理食塩水に再懸濁する。三色分析を、抗CD8-Tricolor、および抗CD38と共に、テトラマーフィトエリトリンで実施する。PBMCを、テトラマーおよび抗体を用いて氷上で30～60分間インキュベートし、次いで、ホルムアルデヒド固定の前に2回洗浄する。ゲートが、99.98%を越えるコントロールサンプルを含むように適用する。テトラマーについてのコントロールとしては、 A^*0201 陰性個体および A^*0201 陽性未感染ドナーの両方が挙げられる。次いで、テトラマーで染色された細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによって決定する。この結果は、エпитープに制限されたCTLを含むPBMCサンプル中の細胞数を示し、これによって、HCVエпитープに対する免疫応答の程度を容易に示し、このようにして、HCV感染の段階または保護的応答もしくは治療的応答を誘発するワクチンへの曝露を示す。

【0337】

(実施例17：リコール応答 (recall response) を評価するためのペプチドエпитープの使用)

本発明のペプチドエпитープを、患者におけるT細胞応答 (例えば、急性応答またはリコール応答) を評価するための試薬として使用する。個のような分析は、感染から回復した患者、HCVに慢性的に感染した患者、またはHCVワクチンでワクチン接種された患者に対して実施され得る。

【0338】

例えば、ワクチン接種された個体のクラスI制限CTL応答を、分析し得る。このワクチンは、任意のHCVワクチンであり得る。PBMCを、ワクチン接種された個体およびHLA型の個体から回収する。次いで、好ましくは高度に保存され、かつ必要に応じて、複数のHLAスーパータイプファミリーのメンバーとの交差反応性を提供するスーパーモチーフを保有する本願の適切なペプチドエпитープを、そのHLA型を保有する個体由来のサンプルの分析のために使用する。

【0339】

ワクチン接種された個体由来のPBMCを、Ficoll-Histopaque

ue密度勾配 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 上で分離し、HBSS (GIBCO Laboratories) 中で3回洗浄し、RPMI-1640 (GIBCO Laboratories) (これは、L-グルタミン (2mM)、ペニシリン (50 U/ml)、ストレプトマイシン (50 μ g/ml)、およびHepes (10mM) が補充され、10% 熱不活性化ヒトAB血清を含む (完全RPMI)) 中に再懸濁し、そして、マイクロ培養 (microculture) 形式を用いてプレートに播く。本発明のエピトープを含む合成ペプチドを、10 μ g/mlで各ウェルに添加し、そしてHBVコア128~140エピトープを、刺激の最初の週の間に、T細胞補助の供給源として1 μ g/mlで各ウェルに添加する。

【0340】

マイクロ培養形式において、 4×10^5 個のPBMCを、96ウェルの丸底プレートにおいて100 μ l/ウェルの完全RPMI中、8個の複製培養物において、ペプチドで刺激する。3日目および10日目に、100mlの完全RPMIおよび20 U/ml最終濃度のrIL-2を各ウェルに添加する。7日目に、培養物を、96ウェルの平底プレートに移し、そして、ペプチド、rIL-2および 10^5 個の照射された (3,000 rad) 自系 (autologous) 支持細胞で刺激する。培養物を、14日目に、細胞傷害活性に関して試験する。陽性のCTL応答は、以前に記載されたように (Rehermannら、Nature Med. 2:1104, 1108, 1996; Rehermannら、J. Clin. Invest. 97:1655-1665, 1996; および Rehermannら、J. Clin. Invest. 98:1432-1440, 1996) 未感染のコントロール被験体との比較に基づいて、10%より大きい特異的 ^{51}Cr 放出を示すために、8個の複製培養物のうちの2つ以上を必要とする。

【0341】

標的細胞株は、自系および同種異系のEBV形質転換B-LCLであり、これらは、American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI, Boston)

n, MA) から購入されるか、または記載されたように (Guilhotら、J Virol. 66:2670-2678、1992) 患者のプールから確立されるかのいずれかである。

【0342】

細胞傷害性アッセイを、以下の様式で実施する。標的細胞は、同種異系のHLAが一致したBリンパ芽球細胞株または自系EBV形質転換Bリンパ芽球細胞株のいずれかからなり、これらの細胞株を、 $10\mu\text{l}$ の本発明の合成ペプチドエピトープを共に一晩インキュベートし、そして $100\mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) を用いて1時間標識し、この後、これらをHBSSで4回洗浄する。

【0343】

細胞傷害活性を、3,000個の標的／ウェルを含むU底の96ウェルプレートを用いて、標準的な4-h、分裂ウェル (split well) ^{51}Cr 放出アッセイにおいて決定する。刺激されたPBMCを、14日目に、20~50:1のエフェクター／標的 (E/T) 比で試験する。パーセント細胞傷害性を、式： $100 \times [(\text{実験的な放出} - \text{自発的な放出}) / (\text{最大の放出} - \text{自発的な放出})]$ から決定する。最大の放出は、界面活性剤 (2% Triton X-100; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) によって、標的の溶解により決定する。自発的な放出は、全ての実験について、最大放出の25%未満である。

【0344】

このような分析の結果は、HLA制限CTL集団がHCVまたはHCVワクチンへの以前の曝露によって刺激された程度を示す。

【0345】

クラスII制限HTL応答がまた、分析され得る。精製されたPBMCを、96ウェル平底プレート中、 1.5×10^5 細胞／ウェルの密度で培養し、そして $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の合成ペプチド、全抗原、またはPHAを用いて刺激する。細胞を、慣用的に、各条件について4~6ウェルの複製でプレートに播く。培養の7日後、この培地を取り除き、そして、 $10\text{U}/\text{ml}$ のIL-2を含む新鮮な培地

で置きかえる。2日後、 $1\mu\text{Ci}$ ^3H -チミジン、各ウェルに添加し、そしてさらなる18時間インキュベーションを続ける。次いで、細胞性のDNAを、ガラスファイバーマット上に収集し、そして、 ^3H -チミジン取りこみについて分析する。抗原特異的T細胞増殖を、抗原の存在下での ^3H -チミジン取りこみを抗原の非存在下での ^3H -チミジン取り込みで割った比として、算出する。

【0346】

(実施例18：ヒトにおける特異的CTL応答の誘導)

本発明のCTLエピトープおよびHTLエピトープを含む免疫原性組成物に関するヒト臨床試験を、INDフェーズI、用量増大研究として設定し、そして、無作為化、二重ブラインドのブラシーボ制御された試験をして実行する。このような試験は、例えば、以下のように設計される：

全部で約27人の被験体を、登録し、そして3群に分ける：

群I：3人の被験体に、ブラシーボを注射し、そして6人の被験体に、 $5\mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する；

群II：3人の被験体に、ブラシーボを注射し、そして6人の被験体に、 $50\mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する；

群III：3人の被験体に、ブラシーボを注射し、そして6人の被験体に、 $500\mu\text{g}$ のペプチド組成物を注射する。

【0347】

最初の注射の4週間後、全ての被験体に同じ投薬量でブースター接種を受けさせる。

【0348】

本研究において測定された終点は、ペプチド組成物の安全性および寛容性ならびにこの組成物の免疫原性に関連する。ペプチド組成物に対する細胞性免疫応答は、このペプチド組成物の固有の活性の指標であり、従って、生物学的効果の測定としてみなされ得る。以下は、臨床データおよび実験室データを要約し、これらのデータは、安全性および効果の終点に関する。

【0349】

安全性：有害事象の発生を、ブラシーボ処置群および薬物処置群においてモニ

ターし、そして、程度および可逆性に関して評価する。

【0350】

ワクチン効果の評価：ワクチン効果の評価に関して、被験体を、注射の前および注射の後に採血する。末梢血単核細胞を、新鮮なヘパリン処理された血液から Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心分離によって単離し、凍結培地に等分し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL 活性および HTL 活性についてアッセイする。

【0351】

ワクチンが、安全かつ有効であることの両方を見出した。

【0352】

(実施例 19：HCV で感染された患者における フェーズ II 試験)

フェーズ II 試験を、慢性 HCV 感染を有する患者への CHL-HTL ペプチド組成物の投与の効果を研究するために実施する。この試験の主要な目的は、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) における一過性拡大 (transient flare)、ALT の正規化、および HCV DNA の減少によって明らかにされるように、慢性的に感染された HCV 患者において CTL を誘導するための有効な用量およびレジメンを決定すること、これらの患者における CTL 応答および HTL 応答を誘導することの安全性を確立すること、および、どの程度まで CTL 活性化が慢性的に感染された CTL 患者の臨床状況を改善するかを調べることである。このような研究は、例えば、以下のように設計される：

本研究は、複数の中心で実施する。試験の設計は、オープン標識、非制御、容量増大プロトコル（ここで、ペプチド組成物を、単一用量として投与し、6 週間後に同じ用量の単一ブースター注射が続く）である。投薬量は、1 回の注射当たり 50、500、および 5,000 μ g である。薬物関連有害効果（重篤さおよび可逆性）を、記録する。

【0353】

3 つの患者群が存在する。第 1 の群を、50 μ g のペプチド組成物で注射し、そして第 2 群および第 3 群を、それぞれ、500 および 5,000 μ g のペプチド組成物で注射する。各群の中の患者は、年齢が 21 ~ 65 歳の範囲であり、男

性および女性の両方を含み、そして多様な民族背景を表す。この患者ら全員を、HCVで5年間以上感染させ、そして、彼ら全員は、HIV陰性、HBV陰性およびデルタ型肝炎ウイルス（HDV）陰性であるが、陽性レベルのHCV抗原を有する。

【0354】

ALT拡大の大きさおよび発生ならびに血液中のHCV DNAのレベルを、ペプチド組成物の投与の効果を評価するためにモニターする。血液中のHCV DNAのレベルは、処置の進行の間接的な指標である。ワクチン組成物が、慢性HCV感染の処置において、安全かつ有効であることの両方を見出す。

【0355】

（実施例20、プライムブースト（prime boost）プロトコルを用いたCTL応答の誘導）

プライムブーストプロトコルをまた、ワクチンのヒトへの投与のために使用し得る。このようなワクチンレジメンとしては、例えば、裸のDNAの初回投与、続くこのワクチンをコードする組換えウイルスを用いたブースト、または組換えタンパク質／ポリペプチドもしくはアジュバント中に投与されたペプチド混合物の初回投与が挙げられる。

【0356】

例えば、初回免疫は、実施例11に構築されたような発現ベクターを用いて、複数の部位に0.5～5mgの量で、IM（またはSCまたはID）で投与される裸の核酸の形態での形態で、実施され得る。核酸（0.1～1000μg）をまた、遺伝子銃を用いて投与し得る。3～4週間のインキュベーション期間の後、ブースター用量を投与する。このブースターは、例えば、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^9$ p.f.u.の用量で投与される組換え鶏痘ウイルスであり得る。代替の組換えウイルス（例えば、MVA、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス）をまた、このブースターに使用し得るか、または、ポリエポトタンパク質もしくはこのペプチドの混合物を投与し得る。ワクチン効果の評価のために、患者の血液サンプルを、免疫前、ならびに処置ワクチンおよびブースター用量のワクチンの投与後の間に得る。末梢血単核細胞を、新鮮なヘパリン処

理された血液からFicoll-Hypaque密度勾配遠心分離によって単離し、凍結培地に等分し、そして凍結保存する。サンプルを、CTL活性およびHTL活性についてアッセイする。

【0357】

この結果の分析は、保護的免疫を達成するか、またはHCV感染を処置するのに十分である大きさの応答が生成されることを示す。

【0358】

(実施例21：樹状細胞を用いたワクチン組成物の投与)

本発明のペプチドエピトープを含むワクチンを、樹状細胞を用いて投与し得る。本実施例において、ペプチドバルスされた樹状細胞を、CTL応答をインビボで刺激するために患者に投与し得る。本方法において、樹状細胞を単離し、増殖し、そして、本発明のペプチドCTLエピトープおよびペプチドHTLエピトープを含むワクチンでバルスする。樹状細胞を、患者に注入して戻し、インビボにおいてCTL応答およびHTL応答を誘発する。次いで、誘導されたCTLおよびHTLは、特定の標的HCV感染細胞（この細胞は、ワクチン中のエピトープが誘導されるタンパク質を保有する）を破壊するか（CTL）またはこの細胞の破壊を容易にする（HTL）。

【0359】

あるいは、特定の腫瘍関連抗原に対するエキソビボのCTL応答またはHTL応答は、組織培養物中、患者または一般的に適合性の、CTLまたはHTL前駆体細胞を抗原提示細胞の供給源（例えば、樹状細胞）および適切な免疫原性ペプチドと共にインキュベートすることによって誘導され得る。前駆体細胞が活性化され、エフェクター細胞に拡大される適切なインキュベーション時間（代表的には約7～28日間）の後、細胞を、患者に注射して戻し、ここで、これらの細胞は、それらの特定の標的細胞（すなわち、腫瘍細胞）を破壊するか（CTL）またはそれらの破壊を容易にする（HTL）。

【0360】

(実施例22：モチーフ保有ペプチドを同定する代替方法)

モチーフ保有ペプチドを同定するための別の方法は、規定されたMHC分子を

保有する細胞からこれらを溶出することである。例えば、組織型決定 (tissue typing) に使用されるEBV形質転換されたB細胞株は、いずれのHLA分子をこの細胞が発現するかを決定するために徹底的に特徴付けられてきた。特定の場合において、これらの細胞は、単一の型のHLA分子のみ発現する。次いで、これらの細胞を、病原性生物 (例えば、HCV) で感染し得るか、または目的の抗原を発現する核酸でトランスフェクトし得る。その後、感染の結果 (またはトランスフェクトの結果として) 産生されたペプチドの内因性抗原プロセッシングによって産生されたペプチドは、細胞表面上に結合して提示される。次いで、これらのペプチドを、温和な酸条件に曝露することによってHLA分子から溶出し、そしてこれらのアミノ酸配列を、例えば、質量スペクトル分析によって決定する (例えば、Kubotaら、J. Immunol. 152:3913、1994)。なぜなら、本明細書中に開示されるように、特定のHLA分子に結合する大部分のペプチドは、モチーフ保有であることから、これは、細胞上に発現された特定のHLA分子と関連したモチーフ保有ペプチドを得るための、代替様式である。

【0361】

あるいは、いずれの内因性HLA分子も発現しない細胞株を、単一のHLA対立遺伝子をコードする発現構築物でトランスフェクトし得る。次いで、これらの細胞を、記載されるように使用し得、すなわち、これらの細胞を、病原もしくは細胞表面上に提示された目的の抗原に対応するペプチドを単離するために、病原性生物で感染し得るか、または目的の抗原をコードする核酸でトランスフェクトし得る。このような分析から得られたペプチドは、この細胞中で発現される単一のHLA対立遺伝子への結合に対応するモチーフを保有する。

【0362】

当業者に明らかなように、当業者は、1より多くのHLA対立遺伝子を保有する細胞について同様の分析を実施し得、そして引続いて発現される各HLA対立遺伝子に特異的なペプチドを決定し得る。さらに、当業者はまた、感染またはトランスフェクト以外の手段 (例えば、タンパク質抗原を用いたローディング (loading)) が、細胞に抗原の供給源を提供するために使用され得ることを

認識する。

【0363】

上記の実施例は、本発明の範囲を制限するためではなく、本発明を例示するために提供した。例えば、主要組織適合遺伝子複合体（すなわち、HLA）に関する人間用語を、本文書を通じて使用する。これらの原理が、他の種も同様に拡張され得ることが理解される。従って、本発明の他の改変は、当業者に容易に明らかであり、そして添付の特許請求の範囲に含まれる。本明細書中に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、全ての目的に関して本明細書中によって参考として援用される。

【0364】

【表2】

表 1

スーパーモチーフ	位置	位置	位置
	2(一次アンカー)	3(二次アンカー)	C末端 (一次アンカー)
A1	T, I, L, V, M, S		F, W, Y
A2	L, I, V, M, A, T, Q		I, V, M, A, T, L
A3	V, S, M, A, T, L, I		R, K
A24	Y, F, W, I, V, L, M, T		F, I, Y, W, L, M
B7	P		V, I, L, F, M, W, Y, A
B27	R, H, K		F, Y, L, W, M, I, V, A
B44	E, D		F, W, L, I, M, V, A
B58	A, T, S		F, W, Y, L, I, V, M, A
B62	Q, L, I, V, M, P		F, W, Y, M, I, V, L, A
モチーフ			
A1	T, S, M		Y
A1		D, E, A, S	Y
A2.1	L, M, V, Q, I, A, T		V, L, I, M, A, T
A3	L, M, V, I, S, A, T, F, C, G, D		K, Y, R, H, F, A
A11	V, T, M, L, I, S, A, G, N, C, D, F		K, R, Y, H
A24	Y, F, W, M		F, L, I, W
A*3101	M, V, T, A, L, I, S		R, K
A*3301	M, V, A, L, F, I, S, T		R, K
A*6801	A, V, T, M, S, L, I		R, K
B*0702	P		L, M, F, W, Y, A, I, V
B*3501	P		L, M, F, W, Y, I, V, A
B51	P		L, I, V, F, W, Y, A, M
B*5301	P		I, M, F, W, Y, A, L, V
B*5401	P		A, T, I, V, L, M, F, W, Y

太字の残基は好ましく、斜字の残基はさほど好ましくない：ペプチドが、上記表に特定するようなモチーフまたはスーパーモチーフのための各一次アンカー位置に一次アンカーを有する場合に、このペプチドはモチーフを保有するとみなされる。

【0365】

【表3】

表 II
位置

	1	2	3	4	5	6	7	8	C 末端
ス-10-ニキ-7									
A1		¹⁰⁷²² - TLLVMS							¹⁰⁷²² - FWY
A2		¹⁰⁷²² - LIVMA							¹⁰⁷²² - LIVMAT
A3	好ましい	¹⁰⁷²² - VSMAT LJ	YFW (45) (35)				YFW (45) (35)	P (45)	¹⁰⁷²² - RK
備考	DE (35), P (35)		DE (45)						
A24		¹⁰⁷²² - YFWLP LMT							¹⁰⁷²² - FVYMLM
B7	好ましい	¹⁰⁷²² - FWY (35) LIVM (35) P	FWY (45)					FWY (35)	¹⁰⁷²² - VILFMYA
備考	DE (35), P (35); Q (45), A (35), QN (35)		DE (35)	G (45)			QN (45)	DE (45)	
B27		¹⁰⁷²² - RHK							¹⁰⁷²² - FVLMVLA
B44		¹⁰⁷²² - EJD							¹⁰⁷²² - FWYLMVA
B58		¹⁰⁷²² - A7S							¹⁰⁷²² - FWYLVMA
B62		¹⁰⁷²² - QLVMP							¹⁰⁷²² - FWYMLVA

(表Ⅱの続き)

		位置									
モーター		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩ C本端
AI	おもしろい	GFY,W	$\frac{1^2 7 2 2}{STM}$	DEA	YFW			DEQN	YFW	$\frac{1^2 7 2 2}{Y}$	
	痛害	DE		RHKLLV MP	A	G	A				
AI	おもしろい	GRHK	$\frac{ASTCLJ}{VM}$	$\frac{1^2 7 2 2}{DEAS}$	GSTC		ASTC	LIVM	DE	$\frac{1^2 7 2 2}{Y}$	
	痛害	A	$\frac{RHKDE}{PYFW}$		DE	PQN	RHK	PG	GP		

(表IIの続き)

位置										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C末端
A1 10 ⁺ 好ましい	YFW	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - STM	DEAQN	A	YFWQN	PASTC	GDE	P	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - Y	
有害	GP		RHKGLJ VM	DE	RHK	QNA	RHKYE, W	RHK	A	
A1 10 ⁺ 好ましい	YFW	STCLIV M	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - DEAS	A	YFW	PG	G	YFW	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - Y	
有害	RHK	RHKDE, PYFW			P	G	PRHK	QN		
A21 9 ⁺ 好ましい	YFW	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - LMIA7	YFW	STC	YFW	A	P	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - VLLMA7		
有害	DEP		DERKH			RKH	DERKH			
A21 10 ⁺ 好ましい	AYFW	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - LMIA7	LYIM	G	G		FYW, LYIM	1 ⁷⁷² 2 ⁷² - VLLMA7		
有害	DEP		DE	RKHA	P	RKH	DER, KH	RKH		

(表1の続き)

位置										
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪ C末端
A3 好ましい	RHK	12722- LMVIS A1FCG D	YFW	PRHKY, FW	A	YFW		P	12722- K1RHHFA	C末端
名称	DEP	DE								
A11 好ましい	A	12722- VTLML SAQNGC ZIF	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	12722- K1RHH	
名称	DEP						A	G		
A24 好ましい	YFWARK	12722- YFWM	DE	G	QNP	DERHK	G	AQN	12722- FLW	
名称	DEG									
A24 好ましい		12722- YFWM		F	YFWP		F		12722- FLW	
名称	RHK	GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA		
A301 好ましい	RHK	12722- MVTAL IS	YFW	F	YFW	YFW	YFW	AQ	12722- RKH	
名称	DEP	DE		ADE	DE	DE	DE	DE		

(表Ⅱの続き)

		位置									
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
B51	好ましい	LIVMF FWY	1°7'24° P	FWY	STC	FWY	Q	FWY	FWY	FWY	C本端 ⑪ 1°7'24° LIVMF FWY YAM
有害		AQPD ERH STC		DE		Q	DEQN	QDE			
B300	好ましい	LIVMF FWY	1°7'24° P	FWY	STC	FWY	LIVMF FWY WY	FWY	FWY	FWY	1°7'24° IMF FWY ALY
有害		AQ PQN				Q	RHKQN	DE			
B5401	好ましい	FWY	1°7'24° P	FWYLLV M		LIVM	ALLVM	FWYAP	FWYAP	FWYAP	1°7'24° ATVVL MF FWY
有害		GPQNDE		QDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

斜字の残基は、ざほど好ましくないかまたは「黙認された」残基を示す。
表Ⅱの情報は、他に特定しない限り、9マーに特定である。

[0366]

【表4】

表 III

モチーフ	$\frac{10}{10}$ アノマー	2	5	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
DR4 好ましい	F, M, Y, L, I, V, W	M	T	W,	I	V, S, T, C, P, A, L, I, M	M, H,	R,	A, V, M	G, D, E, D	M, I, V	G	V, M, S, T, A, C, P, L, I	V, M, A, T, S, P, L, I, C	I, V, M, S, A, C, T, P, L	G, R, D, N																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

斜字の残基は、さほど好ましくないかまたは「黙認された」残基を示す。

[0367]

[表5]

表 IV: HLA クラスI 標準ペプチド結合親和性

対立遺伝子	標準ペプチド	配列 (配列番号)	標準結合親和性 (nM)
A*0101	944.02	YLEPALAKY	25
A*0201	941.01	FLPSDYFPSV	5.0
A*0202	941.01	FLPSDYFPSV	4.3
A*0203	941.01	FLPSDYFPSV	10
A*0205	941.01	FLPSDYFPSV	4.3
A*0206	941.01	FLPSDYFPSV	3.7
A*0207	941.01	FLPSDYFPSV	23
A*6802	1072.34	YVIKVSARV	8.0
A*0301	941.12	KVFPYALINK	11
A*1101	940.06	AVDLYHFLK	6.0
A*3101	941.12	KVFPYALINK	18
A*3301	1083.02	STLPETYVRR	29
A*6801	941.12	KVFPYALINK	8.0
A*2402	979.02	AYIDNYNKF	12
B*0702	1075.23	APRTLVL	5.5
B*3501	1021.05	FPFKYAAAF	7.2
B51	1021.05	FPFKYAAAF	5.5
B*5301	1021.05	FPFKYAAAF	9.3
B*5401	1021.05	FPFKYAAAF	10

【0368】

【表6】

表 V. HLA クラスII 標準ペプチド結合親和性

対立遺伝子	命名	標準 ペプチド	配列 (配列番号)	結合 親和性 (nM)
DRB1*0101	DR1	515.01	PKYVKQNTLKLAT	5.0
DRB1*0301	DR3	829.02	YKTIADFEEARR	300
DRB1*0401	DR4w4	515.01	PKYVKQNTLKLAT	45
DRB1*0404	DR4w14	717.01	YARFQSQTTLKQKT	50
DRB1*0405	DR4w15	717.01	YARFQSQTTLKQKT	38
DRB1*0701	DR7	553.01	QYIKANSKFIGITE	25
DRB1*0802	DR8w2	553.01	QYIKANSKFIGITE	49
DRB1*0803	DR8w3	553.01	QYIKANSKFIGITE	1600
DRB1*0901	DR9	553.01	QYIKANSKFIGITE	75
DRB1*1101	DR5w11	553.01	QYIKANSKFIGITE	20
DRB1*1201	DR5w12	1200.05	EALIHQLKINPYVLS	298
DRB1*1302	DR6w19	650.22	QYIKANAKFIGITE	3.5
DRB1*1501	DR2w2β1	507.02	GRTQDENPVVHFFKNIV TPRIPPP	9.1
DRB3*0101	DR52a	511	NGQIGNDPNRDIL	470
DRB4*0101	DRw53	717.01	YARFQSQTTLKQKT	58
DRB5*0101	DR2w2β2	553.01	QYIKANSKFIGITE	20

【0369】

【表7】

表 VI

HLAスベ-タイプ	抗原	対立遺伝子特異的HLAスベ-タイプ
A1	A*0101, A*2301, A*2601, A*2602, A*3201	A*0102, A*2604, A*2601, A*4301, A*8001
A2	A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*0209, A*0214, A*6802, A*6901	A*0208, A*0210, A*0211, A*0212, A*0213
A3	A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, A*6801	A*0302, A*1102, A*2603, A*3303, A*3401, A*3402, A*6601, A*6602, A*7401
A24	A*2301, A*2402, A*3001	A*2403, A*2404, A*3002, A*3003
B7	B*0702, B*0703, B*0704, B*0705, B*1506, B*3301, B*3502, B*3503, B*3505, B*3506, B*3507, B*3508, B*5101, B*5102, B*5103, B*5104, B*5105, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*5602, B*6701, B*7801	B*1511, B*4201, B*5901
B27	B*1401, B*1402, B*1503, B*2202, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706, B*3801, B*3901, B*3902, B*7301	B*2701, B*2707, B*2708, B*3802, B*3903, B*3904, B*3905, B*4801, B*4802, B*1510, B*1518, B*1503
B44	B*1801, B*1802, B*3701, B*4402, B*4403, B*4404, B*4001, B*4002, B*4006	B*4101, B*4301, B*4701, B*4901, B*5001
D38	B*5701, B*5702, B*5801, B*5802, B*1516, B*1517	B*1301, B*1302, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1515, B*1520, B*1521, B*1512, B*1514, B*1510
B62	B*1501, B*1502, B*1513, B*5201	

a. 特異性がブール配列決定分析、ペプチド結合アッセイ、またはCTLエビトープの配列の分析によって決定された対立遺伝子を含む、検証した対立遺伝子。

b. 予測した対立遺伝子は、その特異性が、BおよびFポケット構造がスーパータイプ特異性とオーバーラップすることに基いて予測される、対立遺伝子である。

【0370】

【表8】

表 VII

HCV ABL 文法-モーフ (結合係数と金比)

配列	位置	配列 位置の数	保率率 (%)	A'0101
ATGACG	185	10	82	
ATGAGC	186	6	100	
ATGAAAT	1817	14	100	
ATGAGAT	1128	9	79	0.3720
ATGAGAT	1129	11	78	
ATGAGAT	1130	11	78	
ATGAGAT	1131	11	78	
ATGAGAT	1132	11	78	
ATGAGAT	1133	11	78	
ATGAGAT	1134	11	78	
ATGAGAT	1135	11	78	
ATGAGAT	1136	11	78	
ATGAGAT	1137	11	78	
ATGAGAT	1138	11	78	
ATGAGAT	1139	11	78	
ATGAGAT	1140	11	78	
ATGAGAT	1141	11	78	
ATGAGAT	1142	11	78	
ATGAGAT	1143	11	78	
ATGAGAT	1144	11	78	
ATGAGAT	1145	11	78	
ATGAGAT	1146	11	78	
ATGAGAT	1147	11	78	
ATGAGAT	1148	11	78	
ATGAGAT	1149	11	78	
ATGAGAT	1150	11	78	
ATGAGAT	1151	11	78	
ATGAGAT	1152	11	78	
ATGAGAT	1153	11	78	
ATGAGAT	1154	11	78	
ATGAGAT	1155	11	78	
ATGAGAT	1156	11	78	
ATGAGAT	1157	11	78	
ATGAGAT	1158	11	78	
ATGAGAT	1159	11	78	
ATGAGAT	1160	11	78	
ATGAGAT	1161	11	78	
ATGAGAT	1162	11	78	
ATGAGAT	1163	11	78	
ATGAGAT	1164	11	78	
ATGAGAT	1165	11	78	
ATGAGAT	1166	11	78	
ATGAGAT	1167	11	78	
ATGAGAT	1168	11	78	
ATGAGAT	1169	11	78	
ATGAGAT	1170	11	78	
ATGAGAT	1171	11	78	
ATGAGAT	1172	11	78	
ATGAGAT	1173	11	78	
ATGAGAT	1174	11	78	
ATGAGAT	1175	11	78	
ATGAGAT	1176	11	78	
ATGAGAT	1177	11	78	
ATGAGAT	1178	11	78	
ATGAGAT	1179	11	78	
ATGAGAT	1180	11	78	
ATGAGAT	1181	11	78	
ATGAGAT	1182	11	78	
ATGAGAT	1183	11	78	
ATGAGAT	1184	11	78	
ATGAGAT	1185	11	78	
ATGAGAT	1186	11	78	
ATGAGAT	1187	11	78	
ATGAGAT	1188	11	78	
ATGAGAT	1189	11	78	
ATGAGAT	1190	11	78	
ATGAGAT	1191	11	78	
ATGAGAT	1192	11	78	
ATGAGAT	1193	11	78	
ATGAGAT	1194	11	78	
ATGAGAT	1195	11	78	
ATGAGAT	1196	11	78	
ATGAGAT	1197	11	78	
ATGAGAT	1198	11	78	
ATGAGAT	1199	11	78	
ATGAGAT	1200	11	78	
ATGAGAT	1201	11	78	
ATGAGAT	1202	11	78	
ATGAGAT	1203	11	78	
ATGAGAT	1204	11	78	
ATGAGAT	1205	11	78	
ATGAGAT	1206	11	78	
ATGAGAT	1207	11	78	
ATGAGAT	1208	11	78	
ATGAGAT	1209	11	78	
ATGAGAT	1210	11	78	
ATGAGAT	1211	11	78	
ATGAGAT	1212	11	78	
ATGAGAT	1213	11	78	
ATGAGAT	1214	11	78	
ATGAGAT	1215	11	78	
ATGAGAT	1216	11	78	
ATGAGAT	1217	11	78	
ATGAGAT	1218	11	78	
ATGAGAT	1219	11	78	
ATGAGAT	1220	11	78	
ATGAGAT	1221	11	78	
ATGAGAT	1222	11	78	
ATGAGAT	1223	11	78	
ATGAGAT	1224	11	78	
ATGAGAT	1225	11	78	
ATGAGAT	1226	11	78	
ATGAGAT	1227	11	78	
ATGAGAT	1228	11	78	
ATGAGAT	1229	11	78	
ATGAGAT	1230	11	78	
ATGAGAT	1231	11	78	
ATGAGAT	1232	11	78	
ATGAGAT	1233	11	78	
ATGAGAT	1234	11	78	
ATGAGAT	1235	11	78	
ATGAGAT	1236	11	78	
ATGAGAT	1237	11	78	
ATGAGAT	1238	11	78	
ATGAGAT	1239	11	78	
ATGAGAT	1240	11	78	
ATGAGAT	1241	11	78	
ATGAGAT	1242	11	78	
ATGAGAT	1243	11	78	
ATGAGAT	1244	11	78	
ATGAGAT	1245	11	78	
ATGAGAT	1246	11	78	
ATGAGAT	1247	11	78	
ATGAGAT	1248	11	78	
ATGAGAT	1249	11	78	
ATGAGAT	1250	11	78	
ATGAGAT	1251	11	78	
ATGAGAT	1252	11	78	
ATGAGAT	1253	11	78	
ATGAGAT	1254	11	78	
ATGAGAT	1255	11	78	
ATGAGAT	1256	11	78	
ATGAGAT	1257	11	78	
ATGAGAT	1258	11	78	
ATGAGAT	1259	11	78	
ATGAGAT	1260	11	78	
ATGAGAT	1261	11	78	
ATGAGAT	1262	11	78	
ATGAGAT	1263	11	78	
ATGAGAT	1264	11	78	
ATGAGAT	1265	11	78	
ATGAGAT	1266	11	78	
ATGAGAT	1267	11	78	
ATGAGAT	1268	11	78	
ATGAGAT	1269	11	78	
ATGAGAT	1270	11	78	
ATGAGAT	1271	11	78	
ATGAGAT	1272	11	78	
ATGAGAT	1273	11	78	
ATGAGAT	1274	11	78	
ATGAGAT	1275	11	78	
ATGAGAT	1276	11	78	
ATGAGAT	1277	11	78	
ATGAGAT	1278	11	78	
ATGAGAT	1279	11	78	
ATGAGAT	1280	11	78	
ATGAGAT	1281	11	78	
ATGAGAT	1282	11	78	
ATGAGAT	1283	11	78	
ATGAGAT	1284	11	78	
ATGAGAT	1285	11	78	
ATGAGAT	1286	11	78	
ATGAGAT	1287	11	78	
ATGAGAT	1288	11	78	
ATGAGAT	1289	11	78	
ATGAGAT	1290	11	78	
ATGAGAT	1291	11	78	
ATGAGAT	1292	11	78	
ATGAGAT	1293	11	78	
ATGAGAT	1294	11	78	
ATGAGAT	1295	11	78	
ATGAGAT	1296	11	78	
ATGAGAT	1297	11	78	
ATGAGAT	1298	11	78	
ATGAGAT	1299	11	78	
ATGAGAT	1300	11	78	
ATGAGAT	1301	11	78	
ATGAGAT	1302	11	78	
ATGAGAT	1303	11	78	
ATGAGAT	1304	11	78	
ATGAGAT	1305	11	78	
ATGAGAT	1306	11	78	
ATGAGAT	1307	11	78	
ATGAGAT	1308	11	78	
ATGAGAT	1309	11	78	
ATGAGAT	1310	11	78	
ATGAGAT	1311	11	78	
ATGAGAT	1312	11	78	
ATGAGAT	1313	11	78	
ATGAGAT	1314	11	78	
ATGAGAT	1315	11	78	
ATGAGAT	1316	11	78	
ATGAGAT	1317	11	78	
ATGAGAT	1318	11	78	
ATGAGAT	1319	11	78	
ATGAGAT	1320	11	78	
ATGAGAT	1321	11	78	
ATGAGAT	1322	11	78	
ATGAGAT	1323	11	78	
ATGAGAT	1324	11	78	
ATGAGAT	1325	11	78	
ATGAGAT	1326	11	78	
ATGAGAT	1327	11	78	
ATGAGAT	1328	11	78	
ATGAGAT	1329	11	78	
ATGAGAT	1330	11	78	
ATGAGAT	1331	11	78	
ATGAGAT	1332	11	78	
ATGAGAT	1333	11	78	
ATGAGAT	1334	11	78	
ATGAGAT	1335	11	78	
ATGAGAT	1336	11	78	
ATGAGAT	1337	11	78	
ATGAGAT	1338	11	78	
ATGAGAT	1339	11	78	
ATGAGAT	1340	11	78	
ATGAGAT	1341	11	78	
ATGAGAT	1342	11	78	
ATGAGAT	1343	11	78	
ATGAGAT	1344	11	78	
ATGAGAT	1345	11	78	
ATGAGAT	1346	11	78	
ATGAGAT	1347	11	78	
ATGAGAT	1348	11	78	
ATGAGAT	1349	11	78	
ATGAGAT	1350	11	78	
ATGAGAT	1351	11	78	
ATGAGAT	1352	11	78	
ATGAGAT	1353	11	78	
ATGAGAT	1354	11	78	
ATGAGAT	1355	11	78	
ATGAGAT	1356	11	78	
ATGAGAT	1357	11	78	
ATGAGAT	1358	11	78	
ATGAGAT	1359	11	78	
ATGAGAT	1360	11	78	
ATGAGAT	1361	11	78	
ATGAGAT	1362	11	78	
ATGAGAT	1363	11	78	
ATGAGAT	1364	11	78	
ATGAGAT	1365	11	78	
ATGAGAT	1366	11	78	
ATGAGAT	1367	11	78	
ATGAGAT	1368	11	78	
ATGAGAT	1369	11	78	
ATGAGAT	1370	11	78	
ATGAGAT	1371	11	78	
ATGAGAT	1372	11	78	
ATGAGAT	1373	11	78	
ATGAGAT	1374	11	78	
ATGAGAT	1375	11	78	
ATGAGAT	1376	11	78	
ATGAGAT	1377	11	78	
ATGAGAT	1378	11	78	
ATGAGAT	1379	11	78	
ATGAGAT	1380	11	78	
ATGAGAT	1381	11	78	
ATGAGAT	1382	11	78	
ATGAGAT	1383	11	78	
ATGAGAT	1384	11	78	
ATGAGAT	1385	11	78	
ATGAGAT	1386	11	78	
ATGAGAT	1387	11	78	
ATGAGAT	1388	11	78	
ATGAGAT	1389	11	78	
ATGAGAT	1390	11	78	
ATGAGAT	1391	11	78	
ATGAGAT	1392	11	78	
ATGAGAT	1393	11	78	
ATGAGAT	1394	11	78	
ATGAGAT	1395	11	78	
ATGAGAT	1396	11	78	
ATGAGAT	1397	11	78	
ATGAGAT	1398	11	78	
ATGAGAT	1399	11	78	
ATGAGAT	1400	11	78	
ATGAGAT	1401	11	78	
ATGAGAT	1402	11	78	
ATGAGAT	1403	11	78	
ATGAGAT	1404	11	78	
ATGAGAT	1405	11	78	
ATGAGAT	1406	11	78	
ATGAGAT	1407	11	78	
ATGAGAT	1408	11	78	
ATGAGAT	1409	11	78	
ATGAGAT	1410	11	78	
ATGAGAT	1411	11	78	
ATGAGAT	1412	11	78	
ATGAGAT	1413	11	78	
ATGAGAT	1414	11	78	
ATGAGAT	1415	11	78	
ATGAGAT	1416	11	78	
ATGAGAT	1417	11	78	
ATGAGAT	1418	11	78	
ATGAGAT	1419	11	78	
ATGAGAT	1420	11	78	
ATGAG				

(表四の続き)

HCY ADL スパモニター (結合情報を含む)

[0371]

[表9]

配列	位置	ア/酸の数	配列頻度	保存率 (%)	A*0101
MCCOLGV	1108	9	11	79	
PIYSTGVF	1295	10	11	79	
PKGSTGRKF	2887	11	11	79	
PSVATLGF	1281	9	14	100	
PLUGPTFLY	1821	11	11	79	
PCLXHLF	1554	9	12	86	
PCKSTGRF	1544	10	12	86	
QDYSLOTF	1484	11	12	86	
RLHLSVF	2918	8	12	86	
RLLRITAY	1029	8	12	86	
RAWQUMANN	317	10	12	86	
RLMLTIF	2875	8	12	86	
RLMLTIF	2875	9	12	86	
RKESNLY	2921	9	14	100	
RKESNLY	1499	9	12	86	
STKPLAV	1242	8	12	86	
SVATLGF	1282	8	14	100	
SVATLGFQAY	1282	11	14	100	
TIMANNEF	2590	9	11	78	
TUGPTFLY	1822	10	11	79	
TUNKGVN	1811	10	12	86	
TUNKGVN	1508	11	12	86	
TUNKGVN	1208	10	12	86	
TUNKGVN	1466	10	12	86	
TUNKGVN	122	9	12	86	
VOLLOGF	1871	8	12	86	
VLAALAY	167	8	12	86	
VLEGGY	1822	8	12	86	
VLEGGY	1822	8	12	86	
VLEGGY	2839	8	11	79	
VLEGGY	2839	10	11	78	
VLEGGY	1820	8	14	100	
WMLRLAF	2848	9	11	79	
YSKXHEF	1106	11	11	79	
YTMCCOLGV	276	10	12	86	
YVGLSSVF	78	2			0.0300

(表2)の続き)

HCVABZスバモーフ(総合情報を含む)

保特字	頻度	位置	配列	A*0201	A*0202	A*0203	A*0206	A*0202
93	13	2573	DTGCRGV					
94	12	2573	DVCRGVV					
95	12	2573	DVCRGVV					
96	12	2573	DVCRGVV					
97	12	2573	DVCRGVV					
98	12	2573	DVCRGVV					
99	12	2573	DVCRGVV					
100	12	2573	DVCRGVV					
101	12	2573	DVCRGVV					
102	12	2573	DVCRGVV					
103	12	2573	DVCRGVV					
104	12	2573	DVCRGVV					
105	12	2573	DVCRGVV					
106	12	2573	DVCRGVV					
107	12	2573	DVCRGVV					
108	12	2573	DVCRGVV					
109	12	2573	DVCRGVV					
110	12	2573	DVCRGVV					
111	12	2573	DVCRGVV					
112	12	2573	DVCRGVV					
113	12	2573	DVCRGVV					
114	12	2573	DVCRGVV					
115	12	2573	DVCRGVV					
116	12	2573	DVCRGVV					
117	12	2573	DVCRGVV					
118	12	2573	DVCRGVV					
119	12	2573	DVCRGVV					
120	12	2573	DVCRGVV					
121	12	2573	DVCRGVV					
122	12	2573	DVCRGVV					
123	12	2573	DVCRGVV					
124	12	2573	DVCRGVV					
125	12	2573	DVCRGVV					
126	12	2573	DVCRGVV					
127	12	2573	DVCRGVV					
128	12	2573	DVCRGVV					
129	12	2573	DVCRGVV					
130	12	2573	DVCRGVV					
131	12	2573	DVCRGVV					
132	12	2573	DVCRGVV					
133	12	2573	DVCRGVV					
134	12	2573	DVCRGVV					
135	12	2573	DVCRGVV					
136	12	2573	DVCRGVV					
137	12	2573	DVCRGVV					
138	12	2573	DVCRGVV					
139	12	2573	DVCRGVV					
140	12	2573	DVCRGVV					
141	12	2573	DVCRGVV					
142	12	2573	DVCRGVV					
143	12	2573	DVCRGVV					
144	12	2573	DVCRGVV					
145	12	2573	DVCRGVV					
146	12	2573	DVCRGVV					
147	12	2573	DVCRGVV					
148	12	2573	DVCRGVV					
149	12	2573	DVCRGVV					
150	12	2573	DVCRGVV					
151	12	2573	DVCRGVV					
152	12	2573	DVCRGVV					
153	12	2573	DVCRGVV					
154	12	2573	DVCRGVV					
155	12	2573	DVCRGVV					
156	12	2573	DVCRGVV					
157	12	2573	DVCRGVV					
158	12	2573	DVCRGVV					
159	12	2573	DVCRGVV					
160	12	2573	DVCRGVV					
161	12	2573	DVCRGVV					
162	12	2573	DVCRGVV					
163	12	2573	DVCRGVV					
164	12	2573	DVCRGVV					
165	12	2573	DVCRGVV					
166	12	2573	DVCRGVV					
167	12	2573	DVCRGVV					
168	12	2573	DVCRGVV					
169	12	2573	DVCRGVV					
170	12	2573	DVCRGVV					
171	12	2573	DVCRGVV					
172	12	2573	DVCRGVV					
173	12	2573	DVCRGVV					
174	12	2573	DVCRGVV					
175	12	2573	DVCRGVV					
176	12	2573	DVCRGVV					
177	12	2573	DVCRGVV					
178	12	2573	DVCRGVV					
179	12	2573	DVCRGVV					
180	12	2573	DVCRGVV					
181	12	2573	DVCRGVV					
182	12	2573	DVCRGVV					
183	12	2573	DVCRGVV					
184	12	2573	DVCRGVV					
185	12	2573	DVCRGVV					
186	12	2573	DVCRGVV					
187	12	2573	DVCRGVV					
188	12	2573	DVCRGVV					
189	12	2573	DVCRGVV					
190	12	2573	DVCRGVV					
191	12	2573	DVCRGVV					
192	12	2573	DVCRGVV					
193	12	2573	DVCRGVV					
194	12	2573	DVCRGVV					
195	12	2573	DVCRGVV					
196	12	2573	DVCRGVV					
197	12	2573	DVCRGVV					
198	12	2573	DVCRGVV					
199	12	2573	DVCRGVV					
200	12	2573	DVCRGVV					

(表題の続き)

HCV ABV 7.2-6.7 (結合情報を含む)

保号	頻度	位置	配列	A*0201	A*0202	A*0203	A*0205	A*0207
74	11	2918	RLQLAPSL					
75	11	2611	RLQPLSL					
76	11	1818	RLQPLSL					
77	11	1818	RLQPLSL					
78	11	1818	RLQPLSL					
79	11	1818	RLQPLSL					
80	11	1818	RLQPLSL					
81	11	1818	RLQPLSL					
82	11	1818	RLQPLSL					
83	11	1818	RLQPLSL					
84	11	1818	RLQPLSL					
85	11	1818	RLQPLSL					
86	11	1818	RLQPLSL					
87	11	1818	RLQPLSL					
88	11	1818	RLQPLSL					
89	11	1818	RLQPLSL					
90	11	1818	RLQPLSL					
91	11	1818	RLQPLSL					
92	11	1818	RLQPLSL					
93	11	1818	RLQPLSL					
94	11	1818	RLQPLSL					
95	11	1818	RLQPLSL					
96	11	1818	RLQPLSL					
97	11	1818	RLQPLSL					
98	11	1818	RLQPLSL					
99	11	1818	RLQPLSL					
100	11	1818	RLQPLSL					
101	11	1818	RLQPLSL					
102	11	1818	RLQPLSL					
103	11	1818	RLQPLSL					
104	11	1818	RLQPLSL					
105	11	1818	RLQPLSL					
106	11	1818	RLQPLSL					
107	11	1818	RLQPLSL					
108	11	1818	RLQPLSL					
109	11	1818	RLQPLSL					
110	11	1818	RLQPLSL					
111	11	1818	RLQPLSL					
112	11	1818	RLQPLSL					
113	11	1818	RLQPLSL					
114	11	1818	RLQPLSL					
115	11	1818	RLQPLSL					
116	11	1818	RLQPLSL					
117	11	1818	RLQPLSL					
118	11	1818	RLQPLSL					
119	11	1818	RLQPLSL					
120	11	1818	RLQPLSL					
121	11	1818	RLQPLSL					
122	11	1818	RLQPLSL					
123	11	1818	RLQPLSL					
124	11	1818	RLQPLSL					
125	11	1818	RLQPLSL					
126	11	1818	RLQPLSL					
127	11	1818	RLQPLSL					
128	11	1818	RLQPLSL					
129	11	1818	RLQPLSL					
130	11	1818	RLQPLSL					
131	11	1818	RLQPLSL					
132	11	1818	RLQPLSL					
133	11	1818	RLQPLSL					
134	11	1818	RLQPLSL					
135	11	1818	RLQPLSL					
136	11	1818	RLQPLSL					
137	11	1818	RLQPLSL					
138	11	1818	RLQPLSL					
139	11	1818	RLQPLSL					
140	11	1818	RLQPLSL					
141	11	1818	RLQPLSL					
142	11	1818	RLQPLSL					
143	11	1818	RLQPLSL					
144	11	1818	RLQPLSL					
145	11	1818	RLQPLSL					
146	11	1818	RLQPLSL					
147	11	1818	RLQPLSL					
148	11	1818	RLQPLSL					
149	11	1818	RLQPLSL					
150	11	1818	RLQPLSL					
151	11	1818	RLQPLSL					
152	11	1818	RLQPLSL					
153	11	1818	RLQPLSL					
154	11	1818	RLQPLSL					
155	11	1818	RLQPLSL					
156	11	1818	RLQPLSL					
157	11	1818	RLQPLSL					
158	11	1818	RLQPLSL					
159	11	1818	RLQPLSL					
160	11	1818	RLQPLSL					
161	11	1818	RLQPLSL					
162	11	1818	RLQPLSL					
163	11	1818	RLQPLSL					
164	11	1818	RLQPLSL					
165	11	1818	RLQPLSL					
166	11	1818	RLQPLSL					
167	11	1818	RLQPLSL					
168	11	1818	RLQPLSL					
169	11	1818	RLQPLSL					
170	11	1818	RLQPLSL					
171	11	1818	RLQPLSL					
172	11	1818	RLQPLSL					
173	11	1818	RLQPLSL					
174	11	1818	RLQPLSL					
175	11	1818	RLQPLSL					
176	11	1818	RLQPLSL					
177	11	1818	RLQPLSL					
178	11	1818	RLQPLSL					
179	11	1818	RLQPLSL					
180	11	1818	RLQPLSL					
181	11	1818	RLQPLSL					
182	11	1818	RLQPLSL					
183	11	1818	RLQPLSL					
184	11	1818	RLQPLSL					
185	11	1818	RLQPLSL					
186	11	1818	RLQPLSL					
187	11	1818	RLQPLSL					
188	11	1818	RLQPLSL					
189	11	1818	RLQPLSL					
190	11	1818	RLQPLSL					
191	11	1818	RLQPLSL					
192	11	1818	RLQPLSL					
193	11	1818	RLQPLSL					
194	11	1818	RLQPLSL					
195	11	1818	RLQPLSL					
196	11	1818	RLQPLSL					
197	11	1818	RLQPLSL					
198	11	1818	RLQPLSL					
199	11	1818	RLQPLSL					
200	11	1818	RLQPLSL					

HCVA882-14-54-7 (結合情報を含む)

(表IXの続き)

係数	頻度	位置	記号	A'0201	A'1101	A'3101	A'3201	A'4801
88	12	93	WAGWLEPR					
89	12	96	WALSPOSR		0.0505			
90	14	1920	WAMRLEAFAR	0.0008				
91	11	17	WAMRLEPR	0.0530	0.0010			
92	13	35	WALRSPSR	0.0014	0.0005	0.0014	0.0420	0.0088
93	11	2920	WPCUSR					
94	14	837	WQGBR					
95	12	1928	WYEDJAM	0.0003	0.0001			
			112					

【0373】

【表11】

HCY A24 スーパーモーター (総合情報を含む)

[illegible]

(発明の要約)

HCV A24 スーパーモーター (結合情報を含む)

配列	位置	7-1 数の数	配列頻度	保存率 (%)	A*2401
AGCGGACG	1416	11	12	86	
AGCGGACG	1417	8	13	79	
AGCGGACG	1418	8	13	86	
AGCGGACG	1419	9	12	86	
AGCGGACG	1420	9	12	86	0.0001
AGCGGACG	1421	9	12	86	
AGCGGACG	1422	9	13	86	
AGCGGACG	1423	10	13	86	
AGCGGACG	1424	10	13	86	
AGCGGACG	1425	10	13	86	
AGCGGACG	1426	10	13	86	
AGCGGACG	1427	10	13	86	
AGCGGACG	1428	10	13	86	
AGCGGACG	1429	10	13	86	
AGCGGACG	1430	10	13	86	
AGCGGACG	1431	10	13	86	
AGCGGACG	1432	10	13	86	
AGCGGACG	1433	10	13	86	
AGCGGACG	1434	10	13	86	
AGCGGACG	1435	10	13	86	
AGCGGACG	1436	10	13	86	
AGCGGACG	1437	10	13	86	
AGCGGACG	1438	10	13	86	
AGCGGACG	1439	10	13	86	
AGCGGACG	1440	10	13	86	
AGCGGACG	1441	10	13	86	
AGCGGACG	1442	10	13	86	
AGCGGACG	1443	10	13	86	
AGCGGACG	1444	10	13	86	
AGCGGACG	1445	10	13	86	
AGCGGACG	1446	10	13	86	
AGCGGACG	1447	10	13	86	
AGCGGACG	1448	10	13	86	
AGCGGACG	1449	10	13	86	
AGCGGACG	1450	10	13	86	
AGCGGACG	1451	10	13	86	
AGCGGACG	1452	10	13	86	
AGCGGACG	1453	10	13	86	
AGCGGACG	1454	10	13	86	
AGCGGACG	1455	10	13	86	
AGCGGACG	1456	10	13	86	
AGCGGACG	1457	10	13	86	
AGCGGACG	1458	10	13	86	
AGCGGACG	1459	10	13	86	
AGCGGACG	1460	10	13	86	
AGCGGACG	1461	10	13	86	
AGCGGACG	1462	10	13	86	
AGCGGACG	1463	10	13	86	
AGCGGACG	1464	10	13	86	
AGCGGACG	1465	10	13	86	
AGCGGACG	1466	10	13	86	
AGCGGACG	1467	10	13	86	
AGCGGACG	1468	10	13	86	
AGCGGACG	1469	10	13	86	
AGCGGACG	1470	10	13	86	
AGCGGACG	1471	10	13	86	
AGCGGACG	1472	10	13	86	
AGCGGACG	1473	10	13	86	
AGCGGACG	1474	10	13	86	
AGCGGACG	1475	10	13	86	
AGCGGACG	1476	10	13	86	
AGCGGACG	1477	10	13	86	
AGCGGACG	1478	10	13	86	
AGCGGACG	1479	10	13	86	
AGCGGACG	1480	10	13	86	
AGCGGACG	1481	10	13	86	
AGCGGACG	1482	10	13	86	
AGCGGACG	1483	10	13	86	
AGCGGACG	1484	10	13	86	
AGCGGACG	1485	10	13	86	
AGCGGACG	1486	10	13	86	
AGCGGACG	1487	10	13	86	
AGCGGACG	1488	10	13	86	
AGCGGACG	1489	10	13	86	
AGCGGACG	1490	10	13	86	
AGCGGACG	1491	10	13	86	
AGCGGACG	1492	10	13	86	
AGCGGACG	1493	10	13	86	
AGCGGACG	1494	10	13	86	
AGCGGACG	1495	10	13	86	
AGCGGACG	1496	10	13	86	
AGCGGACG	1497	10	13	86	
AGCGGACG	1498	10	13	86	
AGCGGACG	1499	10	13	86	
AGCGGACG	1500	10	13	86	

(表XIIの系統き)

HCV B27 X-10-27-7

[illegible]

(表XIIの續き)

HCV B27 スーパー7

並び列	位置	アミノ酸の数	配列頻度	保存率 (%)
YKLVNPSVA 136	1224	11	14	100

【0376】

【表14】

(表2)の続き)

JCV B51 エピモチ-7

配列	位置	アミノ酸	配列頻度	保存率
QMTGQRL	1240	Q	12	85
PMACEDRV	1185	Q	12	85
PMACEDRV	1459	Q	14	100
PMACEDRV	1601	Q	11	79
PMACEDRV	1611	Q	11	79
PMACEDRV	1614	Q	11	79
PMACEDRV	1615	Q	11	79
PMACEDRV	1616	Q	11	79
PMACEDRV	1617	Q	11	79
PMACEDRV	1618	Q	11	79
PMACEDRV	1619	Q	11	79
PMACEDRV	1620	Q	11	79
PMACEDRV	1621	Q	11	79
PMACEDRV	1622	Q	11	79
PMACEDRV	1623	Q	11	79
PMACEDRV	1624	Q	11	79
PMACEDRV	1625	Q	11	79
PMACEDRV	1626	Q	11	79
PMACEDRV	1627	Q	11	79
PMACEDRV	1628	Q	11	79
PMACEDRV	1629	Q	11	79
PMACEDRV	1630	Q	11	79
PMACEDRV	1631	Q	11	79
PMACEDRV	1632	Q	11	79
PMACEDRV	1633	Q	11	79
PMACEDRV	1634	Q	11	79
PMACEDRV	1635	Q	11	79
PMACEDRV	1636	Q	11	79
PMACEDRV	1637	Q	11	79
PMACEDRV	1638	Q	11	79
PMACEDRV	1639	Q	11	79
PMACEDRV	1640	Q	11	79
PMACEDRV	1641	Q	11	79
PMACEDRV	1642	Q	11	79
PMACEDRV	1643	Q	11	79
PMACEDRV	1644	Q	11	79
PMACEDRV	1645	Q	11	79
PMACEDRV	1646	Q	11	79
PMACEDRV	1647	Q	11	79
PMACEDRV	1648	Q	11	79
PMACEDRV	1649	Q	11	79
PMACEDRV	1650	Q	11	79
PMACEDRV	1651	Q	11	79
PMACEDRV	1652	Q	11	79
PMACEDRV	1653	Q	11	79
PMACEDRV	1654	Q	11	79
PMACEDRV	1655	Q	11	79
PMACEDRV	1656	Q	11	79
PMACEDRV	1657	Q	11	79
PMACEDRV	1658	Q	11	79
PMACEDRV	1659	Q	11	79
PMACEDRV	1660	Q	11	79
PMACEDRV	1661	Q	11	79
PMACEDRV	1662	Q	11	79
PMACEDRV	1663	Q	11	79
PMACEDRV	1664	Q	11	79
PMACEDRV	1665	Q	11	79
PMACEDRV	1666	Q	11	79
PMACEDRV	1667	Q	11	79
PMACEDRV	1668	Q	11	79
PMACEDRV	1669	Q	11	79
PMACEDRV	1670	Q	11	79
PMACEDRV	1671	Q	11	79
PMACEDRV	1672	Q	11	79
PMACEDRV	1673	Q	11	79
PMACEDRV	1674	Q	11	79
PMACEDRV	1675	Q	11	79
PMACEDRV	1676	Q	11	79
PMACEDRV	1677	Q	11	79
PMACEDRV	1678	Q	11	79
PMACEDRV	1679	Q	11	79
PMACEDRV	1680	Q	11	79
PMACEDRV	1681	Q	11	79
PMACEDRV	1682	Q	11	79
PMACEDRV	1683	Q	11	79
PMACEDRV	1684	Q	11	79
PMACEDRV	1685	Q	11	79
PMACEDRV	1686	Q	11	79
PMACEDRV	1687	Q	11	79
PMACEDRV	1688	Q	11	79
PMACEDRV	1689	Q	11	79
PMACEDRV	1690	Q	11	79
PMACEDRV	1691	Q	11	79
PMACEDRV	1692	Q	11	79
PMACEDRV	1693	Q	11	79
PMACEDRV	1694	Q	11	79
PMACEDRV	1695	Q	11	79
PMACEDRV	1696	Q	11	79
PMACEDRV	1697	Q	11	79
PMACEDRV	1698	Q	11	79
PMACEDRV	1699	Q	11	79
PMACEDRV	1700	Q	11	79

(表頭の続き)

HCY HSB Zがモナ-7

配列	位置	7-メットの数	配列頻度	保存率 (%)
PALSPQALW	1889	11	12	86
PSVAALIGDA	1281	11	14	100
PIDYVUSNM	109	11	12	86
PTHYVUSMA	1938	11	12	86
PIHGPTLLY	1821	11	11	79
PIHAGLGLV	1820	11	12	83
CAETGASLV	1840	11	13	88
QAPPSSWQAM	1603	11	12	86
CIYGSLLDTF	1603	11	11	79
PSOFGGPGP	1465	11	11	79
SAOLEVVTST	55	11	12	86
SSASGLAPL	1655	11	13	93
SEKATPMAL	2206	11	11	79
ETWLVGDA	1683	11	13	93
TARHPWAM	2852	11	12	86
TSLTPQWCV	1050	11	11	79
TSTWLVGVL	1050	11	12	86
TTLFALSTLL	895	11	12	86
VAGVAVPMA	1864	11	12	86
VAGVAVPMA	1864	11	24	100
VAGVAVPMA	874	11	14	100
VAGVAVPMA	874	11	12	86
VAYOATVCAR	1592	11	11	79
VAYVGLDVE	1420	11	11	79
VSTWLVGCV	1881	11	14	100
WAGVAVPMA	1881	11	12	86
WAGVAVPMA	78	11	12	86
WAGVAVPMA	924	11	12	86
YAGVAVPMA	1248	11	11	79
YAGVAVPMA	164	11	12	86
YAGVAVPMA	1106	11	11	79

288

[0377]

[表15]

(表2の続表)

HCY 062 スパンネージ

面列	位置	面列の数	面列の頻度	保存率 (%)
PMELTIF	2875	3	12	86
PMELTIL	2876	4	12	96
PMELTSH	2877	4	12	86
PMERUAL	2878	4	14	100
PMERNAY	2879	4	12	86
PMERNAY	2880	4	14	96
PMERUJL	2881	4	14	100
SLUPPTIL	1476	4	14	100
SPONREY	2881	4	11	78
SPONREY	2882	4	11	78
SELEAVIL	2883	4	11	78
SVIATIGP	2288	7	13	93
THAGREY	2536	4	14	100
THAGREY	2537	4	11	78
THAGREY	2538	4	11	78
THAGREY	2539	4	11	78
THAGREY	2540	4	11	78
THAGREY	2541	4	11	78
THAGREY	2542	4	11	78
THAGREY	2543	4	11	78
THAGREY	2544	4	11	78
THAGREY	2545	4	11	78
THAGREY	2546	4	11	78
THAGREY	2547	4	11	78
THAGREY	2548	4	11	78
THAGREY	2549	4	11	78
THAGREY	2550	4	11	78
THAGREY	2551	4	11	78
THAGREY	2552	4	11	78
THAGREY	2553	4	11	78
THAGREY	2554	4	11	78
THAGREY	2555	4	11	78
THAGREY	2556	4	11	78
THAGREY	2557	4	11	78
THAGREY	2558	4	11	78
THAGREY	2559	4	11	78
THAGREY	2560	4	11	78
THAGREY	2561	4	11	78
THAGREY	2562	4	11	78
THAGREY	2563	4	11	78
THAGREY	2564	4	11	78
THAGREY	2565	4	11	78
THAGREY	2566	4	11	78
THAGREY	2567	4	11	78
THAGREY	2568	4	11	78
THAGREY	2569	4	11	78
THAGREY	2570	4	11	78
THAGREY	2571	4	11	78
THAGREY	2572	4	11	78
THAGREY	2573	4	11	78
THAGREY	2574	4	11	78
THAGREY	2575	4	11	78
THAGREY	2576	4	11	78
THAGREY	2577	4	11	78
THAGREY	2578	4	11	78
THAGREY	2579	4	11	78
THAGREY	2580	4	11	78
THAGREY	2581	4	11	78
THAGREY	2582	4	11	78
THAGREY	2583	4	11	78
THAGREY	2584	4	11	78
THAGREY	2585	4	11	78
THAGREY	2586	4	11	78
THAGREY	2587	4	11	78
THAGREY	2588	4	11	78
THAGREY	2589	4	11	78
THAGREY	2590	4	11	78
THAGREY	2591	4	11	78
THAGREY	2592	4	11	78
THAGREY	2593	4	11	78
THAGREY	2594	4	11	78
THAGREY	2595	4	11	78
THAGREY	2596	4	11	78
THAGREY	2597	4	11	78
THAGREY	2598	4	11	78
THAGREY	2599	4	11	78
THAGREY	2600	4	11	78
THAGREY	2601	4	11	78
THAGREY	2602	4	11	78
THAGREY	2603	4	11	78
THAGREY	2604	4	11	78
THAGREY	2605	4	11	78
THAGREY	2606	4	11	78
THAGREY	2607	4	11	78
THAGREY	2608	4	11	78
THAGREY	2609	4	11	78
THAGREY	2610	4	11	78
THAGREY	2611	4	11	78
THAGREY	2612	4	11	78
THAGREY	2613	4	11	78
THAGREY	2614	4	11	78
THAGREY	2615	4	11	78
THAGREY	2616	4	11	78
THAGREY	2617	4	11	78
THAGREY	2618	4	11	78
THAGREY	2619	4	11	78
THAGREY	2620	4	11	78
THAGREY	2621	4	11	78
THAGREY	2622	4	11	78
THAGREY	2623	4	11	78
THAGREY	2624	4	11	78
THAGREY	2625	4	11	78
THAGREY	2626	4	11	78
THAGREY	2627	4	11	78
THAGREY	2628	4	11	78
THAGREY	2629	4	11	78
THAGREY	2630	4	11	78
THAGREY	2631	4	11	78
THAGREY	2632	4	11	78
THAGREY	2633	4	11	78
THAGREY	2634	4	11	78
THAGREY	2635	4	11	78
THAGREY	2636	4	11	78
THAGREY	2637	4	11	78
THAGREY	2638	4	11	78
THAGREY	2639	4	11	78
THAGREY	2640	4	11	78
THAGREY	2641	4	11	78
THAGREY	2642	4	11	78
THAGREY	2643	4	11	78
THAGREY	2644	4	11	78
THAGREY	2645	4	11	78
THAGREY	2646	4	11	78
THAGREY	2647	4	11	78
THAGREY	2648	4	11	78
THAGREY	2649	4	11	78
THAGREY	2650	4	11	78
THAGREY	2651	4	11	78
THAGREY	2652	4	11	78
THAGREY	2653	4	11	78
THAGREY	2654	4	11	78
THAGREY	2655	4	11	78
THAGREY	2656	4	11	78
THAGREY	2657	4	11	78
THAGREY	2658	4	11	78
THAGREY	2659	4	11	78
THAGREY	2660	4	11	78
THAGREY	2661	4	11	78
THAGREY	2662	4	11	78
THAGREY	2663	4	11	78
THAGREY	2664	4	11	78
THAGREY	2665	4	11	78
THAGREY	2666	4	11	78
THAGREY	2667	4	11	78
THAGREY	2668	4	11	78
THAGREY	2669	4	11	78
THAGREY	2670	4	11	78
THAGREY	2671	4	11	78
THAGREY	2672	4	11	78
THAGREY	2673	4	11	78
THAGREY	2674	4	11	78
THAGREY	2675	4	11	78
THAGREY	2676	4	11	78
THAGREY	2677	4	11	78
THAGREY	2678	4	11	78
THAGREY	2679	4	11	78
THAGREY	2680	4	11	78
THAGREY	2681	4	11	78
THAGREY	2682	4	11	78
THAGREY	2683	4	11	78
THAGREY	2684	4	11	78
THAGREY	2685	4	11	78
THAGREY	2686	4	11	78
THAGREY	2687	4	11	78
THAGREY	2688	4	11	78
THAGREY	2689	4	11	78
THAGREY	2690	4	11	78
THAGREY	2691	4	11	78
THAGREY	2692	4	11	78
THAGREY	2693	4	11	78
THAGREY	2694	4	11	78
THAGREY	2695	4	11	78
THAGREY	2696	4	11	78
THAGREY	2697	4	11	78
THAGREY	2698	4	11	78
THAGREY	2699	4	11	78
THAGREY	2700	4	11	78
THAGREY	2701	4	11	78
THAGREY	2702	4	11	78
THAGREY	2703	4	11	78
THAGREY	2704	4	11	78
THAGREY	2705	4	11	78
THAGREY	2706	4	11	78
THAGREY	2707	4	11	78
THAGREY	2708	4	11	78
THAGREY	2709	4	11	78
THAGREY	2710	4	11	78
THAGREY	2711	4	11	78
THAGREY	2712	4	11	78
THAGREY	2713	4	11	78
THAGREY	2714	4	11	78
THAGREY	2715	4	11	78
THAGREY	2716	4	11	78
THAGREY	2717	4	11	78
THAGREY	2718	4	11	78
THAGREY	2719	4	11	78
THAGREY	2720	4	11	78
THAGREY	2721	4	11	78
THAGREY	2722	4	11	78
THAGREY	2723	4	11	78
THAGREY	2724	4	11	78
THAGREY	2725	4	11	78
THAGREY	2726	4	11	78
THAGREY	2727	4	11	78
THAGREY	2728	4	11	78
THAGREY	2729	4	11	78
THAGREY	2730	4	11	78
THAGREY	2731	4	11	78
THAGREY	2732	4	11	78
THAGREY	2733	4	11	78
THAGREY	2734	4	11	78
THAGREY	2735	4	11	78
THAGREY	2736	4	11	78
THAGREY	2737	4	11	78
THAGREY	2738	4	11	78
THAGREY	2739	4	11	78
THAGREY	2740	4	11	78
THAGREY	2741	4	11	78
THAGREY	2742	4	11	78
THAGREY	2743	4	11	78
THAGREY	2744	4	11	78
THAGREY	2745	4	11	78
THAGREY	2746	4	11	78
THAGREY	2747	4	11	78
THAGREY	2748	4	11	78
THAGREY	2749	4	11	78
THAGREY	2750	4	11	78
THAGREY	2751	4	11	78
THAGREY	2752	4	11	78
THAGREY	2753	4	11	78
THAGREY	2754	4	11	78
THAGREY	2755	4	11	78
THAGREY	2756	4	11	78
THAGREY	2757	4	11	78
THAGREY	2758	4	11	78
THAGREY	2759	4	11	78
THAGREY	2760	4	11	78
THAGREY	2761	4	11	78
THAGREY	2762	4	11	78
THAGREY	2763	4	11	78
THAGREY	2764	4	11	78
THAGREY	2765	4	11	78
THAGREY	2766	4	11	78
THAGREY	2767	4	11	78
THAGREY	2768	4	11	78
THAGREY	2769	4	11	78
THAGREY	2770	4	11	78
THAGREY	2771	4	11	78
THAGREY	2772	4	11	78
THAGREY	2773	4	11	78
THAGREY	2774	4	11	78
THAGREY	2775	4	11	78
THAGREY	2776	4	11	78
THAGREY	2777	4	11	78
THAGREY	2778	4	11	78
THAGREY	2779	4	11	78
THAGREY	2780	4	11	78
THAGREY	2781	4	11	78
THAGREY	2782	4	11	78
THAGREY	2783	4	11	78
THAGREY	2784	4	11	78
THAGREY	2785	4	11	78
THAGREY	2786	4	11	78
THAGREY	2787	4	11	78
THAGREY	2788	4	11	78
THAGREY	2789	4	11	78
THAGREY	2790	4	11	78
THAGREY	2791	4	11	78
THAGREY	2792	4	11	78
THAGREY	2793	4	11	78
THAGREY	2794	4	11	78
THAGREY	2795	4	11	78
THAGREY	2796	4	11	78
THAGREY	2797	4	11	78
THAGREY	2798	4	11	78
THAGREY	2799	4	11	78
THAGREY	2800	4	11	78
THAGREY	2801	4	11	78
THAGREY	2802	4	11	78
THAGREY	2803	4	11	78
THAGREY	2804	4	11	78
THAGREY	2805	4	11	78
THAGREY	2806	4	11	

(表2の続表)

HCV B型ウイルス-7

配列	位置	7-領域の数	配列頻度	保存率
ORAEKQNY	154	11	12	95
IRAEKQNY	155	11	12	95
IRAEKQNY	156	11	12	93
IRAEKQNY	157	11	11	79
IRAEKQNY	158	11	11	85
HAGRGQAW	1610	11	11	85
ILGGWACIA	1712	11	12	85
ESQALVQV	1831	11	12	85
ESQALVQV	1881	11	13	93
EPALVFFD	2008	11	11	79
EPALVFFD	2009	11	11	79
EPALVFFD	2010	11	11	79
EPALVFFD	2011	11	12	85
EPALVFFD	2012	11	12	85
EPALVFFD	2013	11	12	85
EPALVFFD	2014	11	12	85
EPALVFFD	2015	11	12	85
EPALVFFD	2016	11	12	85
EPALVFFD	2017	11	12	85
EPALVFFD	2018	11	12	85
EPALVFFD	2019	11	12	85
EPALVFFD	2020	11	12	85
EPALVFFD	2021	11	12	85
EPALVFFD	2022	11	12	85
EPALVFFD	2023	11	12	85
EPALVFFD	2024	11	12	85
EPALVFFD	2025	11	12	85
EPALVFFD	2026	11	12	85
EPALVFFD	2027	11	12	85
EPALVFFD	2028	11	12	85
EPALVFFD	2029	11	12	85
EPALVFFD	2030	11	12	85
EPALVFFD	2031	11	12	85
EPALVFFD	2032	11	12	85
EPALVFFD	2033	11	12	85
EPALVFFD	2034	11	12	85
EPALVFFD	2035	11	12	85
EPALVFFD	2036	11	12	85
EPALVFFD	2037	11	12	85
EPALVFFD	2038	11	12	85
EPALVFFD	2039	11	12	85
EPALVFFD	2040	11	12	85
EPALVFFD	2041	11	12	85
EPALVFFD	2042	11	12	85
EPALVFFD	2043	11	12	85
EPALVFFD	2044	11	12	85
EPALVFFD	2045	11	12	85
EPALVFFD	2046	11	12	85
EPALVFFD	2047	11	12	85
EPALVFFD	2048	11	12	85
EPALVFFD	2049	11	12	85
EPALVFFD	2050	11	12	85
EPALVFFD	2051	11	12	85
EPALVFFD	2052	11	12	85
EPALVFFD	2053	11	12	85
EPALVFFD	2054	11	12	85
EPALVFFD	2055	11	12	85
EPALVFFD	2056	11	12	85
EPALVFFD	2057	11	12	85
EPALVFFD	2058	11	12	85
EPALVFFD	2059	11	12	85
EPALVFFD	2060	11	12	85
EPALVFFD	2061	11	12	85
EPALVFFD	2062	11	12	85
EPALVFFD	2063	11	12	85
EPALVFFD	2064	11	12	85
EPALVFFD	2065	11	12	85
EPALVFFD	2066	11	12	85
EPALVFFD	2067	11	12	85
EPALVFFD	2068	11	12	85
EPALVFFD	2069	11	12	85
EPALVFFD	2070	11	12	85
EPALVFFD	2071	11	12	85
EPALVFFD	2072	11	12	85
EPALVFFD	2073	11	12	85
EPALVFFD	2074	11	12	85
EPALVFFD	2075	11	12	85
EPALVFFD	2076	11	12	85
EPALVFFD	2077	11	12	85
EPALVFFD	2078	11	12	85
EPALVFFD	2079	11	12	85
EPALVFFD	2080	11	12	85
EPALVFFD	2081	11	12	85
EPALVFFD	2082	11	12	85
EPALVFFD	2083	11	12	85
EPALVFFD	2084	11	12	85
EPALVFFD	2085	11	12	85
EPALVFFD	2086	11	12	85
EPALVFFD	2087	11	12	85
EPALVFFD	2088	11	12	85
EPALVFFD	2089	11	12	85
EPALVFFD	2090	11	12	85
EPALVFFD	2091	11	12	85
EPALVFFD	2092	11	12	85
EPALVFFD	2093	11	12	85
EPALVFFD	2094	11	12	85
EPALVFFD	2095	11	12	85
EPALVFFD	2096	11	12	85
EPALVFFD	2097	11	12	85
EPALVFFD	2098	11	12	85
EPALVFFD	2099	11	12	85
EPALVFFD	2100	11	12	85
EPALVFFD	2101	11	12	85
EPALVFFD	2102	11	12	85
EPALVFFD	2103	11	12	85
EPALVFFD	2104	11	12	85
EPALVFFD	2105	11	12	85
EPALVFFD	2106	11	12	85
EPALVFFD	2107	11	12	85
EPALVFFD	2108	11	12	85
EPALVFFD	2109	11	12	85
EPALVFFD	2110	11	12	85
EPALVFFD	2111	11	12	85
EPALVFFD	2112	11	12	85
EPALVFFD	2113	11	12	85
EPALVFFD	2114	11	12	85
EPALVFFD	2115	11	12	85
EPALVFFD	2116	11	12	85
EPALVFFD	2117	11	12	85
EPALVFFD	2118	11	12	85
EPALVFFD	2119	11	12	85
EPALVFFD	2120	11	12	85
EPALVFFD	2121	11	12	85
EPALVFFD	2122	11	12	85
EPALVFFD	2123	11	12	85
EPALVFFD	2124	11	12	85
EPALVFFD	2125	11	12	85
EPALVFFD	2126	11	12	85
EPALVFFD	2127	11	12	85
EPALVFFD	2128	11	12	85
EPALVFFD	2129	11	12	85
EPALVFFD	2130	11	12	85
EPALVFFD	2131	11	12	85
EPALVFFD	2132	11	12	85
EPALVFFD	2133	11	12	85
EPALVFFD	2134	11	12	85
EPALVFFD	2135	11	12	85
EPALVFFD	2136	11	12	85
EPALVFFD	2137	11	12	85
EPALVFFD	2138	11	12	85
EPALVFFD	2139	11	12	85
EPALVFFD	2140	11	12	85
EPALVFFD	2141	11	12	85
EPALVFFD	2142	11	12	85
EPALVFFD	2143	11	12	85
EPALVFFD	2144	11	12	85
EPALVFFD	2145	11	12	85
EPALVFFD	2146	11	12	85
EPALVFFD	2147	11	12	85
EPALVFFD	2148	11	12	85
EPALVFFD	2149	11	12	85
EPALVFFD	2150	11	12	85
EPALVFFD	2151	11	12	85
EPALVFFD	2152	11	12	85
EPALVFFD	2153	11	12	85
EPALVFFD	2154	11	12	85
EPALVFFD	2155	11	12	85
EPALVFFD	2156	11	12	85
EPALVFFD	2157	11	12	85
EPALVFFD	2158	11	12	85
EPALVFFD	2159	11	12	85
EPALVFFD	2160	11	12	85
EPALVFFD	2161	11	12	85
EPALVFFD	2162	11	12	85
EPALVFFD	2163	11	12	85
EPALVFFD	2164	11	12	85
EPALVFFD	2165	11	12	85
EPALVFFD	2166	11	12	85
EPALVFFD	2167	11	12	85
EPALVFFD	2168	11	12	85
EPALVFFD	2169	11	12	85
EPALVFFD	2170	11	12	85
EPALVFFD	2171	11	12	85
EPALVFFD	2172	11	12	85
EPALVFFD	2173	11	12	85
EPALVFFD	2174	11	12	85

表 XV HCV A01 モチーフ (結合情報も含む)

配列	位置	配列頻度	保残率 (%)	A*0101
ASFCQSPY	166	26.0026	0	100
ENSVLSRKY	737	20.0255	10	90
GFAPFTQCY	830	20.0254	10	95
GHETWLEY	140		11	95
GYSINFMGY	579	2.0058	9	75
HLVWAGLY	148	1009.04	10	85
KDAFTFSPT	653	20.0250	10	100
LDTASALY	30	1005.01	9	95
LDLQSAFV	416	1005.07	-10	85
LTSWQFSL	327		11	75
MAWYKFSLY	103	1025.01	10	95
MSITOLEY	124	2.0125	9	80
NSVLSRKY	738	1147.12	18	80
PLNGKMPY	124	1065.03	10	100
PLTGKMPY	797	1065.09	9	85
SPKQKSPY	165		9	100
STGLQFVY	415	1065.02	9	95
STIGLEAY	786		8	75
TGHTISLY	414	26.0020	17	85
VLKLVSAFV	414	20.0251	11	95
WAWYWKFS	338	1039.06	11	95
YFALMPLY	640	15.0614	0	95
YSLNFMGY	580	26.0032	0	85
25			17	

【0379】

【表17】

(表四の続き)

NCVΔ03 モータ(組合格組を記)

配列	位置	7ミ/順の数	配列精度	合格率	A'0201
GVMAAAAF	2006	11	11	78	
GVMAAAAF	1689	8	12	88	
GVMAAAAF	1689	8	12	86	
GVMAAAAF	32	10	12	82	
GVMAAAAF	32	8	13	83	
GVMAAAAF	1618	8	13	83	
GVMAAAAF	1323	8	14	100	0.0003
GVMAAAAF	3233	8	14	100	
GVMAAAAF	1552	8	11	79	
GVMAAAAF	1552	11	12	83	
GVMAAAAF	1504	8	11	78	
GVMAAAAF	2021	8	11	78	
GVMAAAAF	2021	10	11	78	
GVMAAAAF	1727	10	14	100	0.0100
GVMAAAAF	1569	8	12	88	
GVMAAAAF	1238	10	12	88	
GVMAAAAF	1131	11	12	88	
GVMAAAAF	1131	11	12	88	
GVMAAAAF	2063	8	11	78	
GVMAAAAF	1853	8	12	88	
GVMAAAAF	1853	8	12	88	
GVMAAAAF	1853	10	12	88	0.3800
GVMAAAAF	1081	10	11	78	
GVMAAAAF	2035	10	11	78	
GVMAAAAF	1570	8	12	88	0.0014
GVMAAAAF	45	11	12	88	0.0046
GVMAAAAF	2518	8	14	100	
GVMAAAAF	154	11	14	100	
GVMAAAAF	154	11	12	78	
GVMAAAAF	154	10	11	78	
GVMAAAAF	33	11	11	78	
GVMAAAAF	171	11	12	83	
GVMAAAAF	1141	8	11	78	

(表2)の続き)

HCV A01 塩化ナトリウム (経済情報を含む)

配列	位置	72/酸の数	配列頻度 (%)	集中度	A*0501
HA000000	1141	10	11	79	
HA000001	1142	10	14	100	
HA000002	1143	10	14	100	
HA000003	1144	10	14	100	
HA000004	1145	10	14	100	
HA000005	1146	10	14	100	
HA000006	1147	10	14	100	
HA000007	1148	10	14	100	
HA000008	1149	10	14	100	
HA000009	1150	10	14	100	
HA000010	1151	10	14	100	
HA000011	1152	10	14	100	
HA000012	1153	10	14	100	
HA000013	1154	10	14	100	
HA000014	1155	10	14	100	
HA000015	1156	10	14	100	
HA000016	1157	10	14	100	
HA000017	1158	10	14	100	
HA000018	1159	10	14	100	
HA000019	1160	10	14	100	
HA000020	1161	10	14	100	
HA000021	1162	10	14	100	
HA000022	1163	10	14	100	
HA000023	1164	10	14	100	
HA000024	1165	10	14	100	
HA000025	1166	10	14	100	
HA000026	1167	10	14	100	
HA000027	1168	10	14	100	
HA000028	1169	10	14	100	
HA000029	1170	10	14	100	
HA000030	1171	10	14	100	
HA000031	1172	10	14	100	
HA000032	1173	10	14	100	
HA000033	1174	10	14	100	
HA000034	1175	10	14	100	
HA000035	1176	10	14	100	
HA000036	1177	10	14	100	
HA000037	1178	10	14	100	
HA000038	1179	10	14	100	
HA000039	1180	10	14	100	
HA000040	1181	10	14	100	
HA000041	1182	10	14	100	
HA000042	1183	10	14	100	
HA000043	1184	10	14	100	
HA000044	1185	10	14	100	
HA000045	1186	10	14	100	
HA000046	1187	10	14	100	
HA000047	1188	10	14	100	
HA000048	1189	10	14	100	
HA000049	1190	10	14	100	
HA000050	1191	10	14	100	
HA000051	1192	10	14	100	
HA000052	1193	10	14	100	
HA000053	1194	10	14	100	
HA000054	1195	10	14	100	
HA000055	1196	10	14	100	
HA000056	1197	10	14	100	
HA000057	1198	10	14	100	
HA000058	1199	10	14	100	
HA000059	1200	10	14	100	
HA000060	1201	10	14	100	
HA000061	1202	10	14	100	
HA000062	1203	10	14	100	
HA000063	1204	10	14	100	
HA000064	1205	10	14	100	
HA000065	1206	10	14	100	
HA000066	1207	10	14	100	
HA000067	1208	10	14	100	
HA000068	1209	10	14	100	
HA000069	1210	10	14	100	
HA000070	1211	10	14	100	
HA000071	1212	10	14	100	
HA000072	1213	10	14	100	
HA000073	1214	10	14	100	
HA000074	1215	10	14	100	
HA000075	1216	10	14	100	
HA000076	1217	10	14	100	
HA000077	1218	10	14	100	
HA000078	1219	10	14	100	
HA000079	1220	10	14	100	
HA000080	1221	10	14	100	
HA000081	1222	10	14	100	
HA000082	1223	10	14	100	
HA000083	1224	10	14	100	
HA000084	1225	10	14	100	
HA000085	1226	10	14	100	
HA000086	1227	10	14	100	
HA000087	1228	10	14	100	
HA000088	1229	10	14	100	
HA000089	1230	10	14	100	
HA000090	1231	10	14	100	
HA000091	1232	10	14	100	
HA000092	1233	10	14	100	
HA000093	1234	10	14	100	
HA000094	1235	10	14	100	
HA000095	1236	10	14	100	
HA000096	1237	10	14	100	
HA000097	1238	10	14	100	
HA000098	1239	10	14	100	
HA000099	1240	10	14	100	
HA000100	1241	10	14	100	
HA000101	1242	10	14	100	
HA000102	1243	10	14	100	
HA000103	1244	10	14	100	
HA000104	1245	10	14	100	
HA000105	1246	10	14	100	
HA000106	1247	10	14	100	
HA000107	1248	10	14	100	
HA000108	1249	10	14	100	
HA000109	1250	10	14	100	
HA000110	1251	10	14	100	
HA000111	1252	10	14	100	
HA000112	1253	10	14	100	
HA000113	1254	10	14	100	
HA000114	1255	10	14	100	
HA000115	1256	10	14	100	
HA000116	1257	10	14	100	
HA000117	1258	10	14	100	
HA000118	1259	10	14	100	
HA000119	1260	10	14	100	
HA000120	1261	10	14	100	
HA000121	1262	10	14	100	
HA000122	1263	10	14	100	
HA000123	1264	10	14	100	
HA000124	1265	10	14	100	
HA000125	1266	10	14	100	
HA000126	1267	10	14	100	
HA000127	1268	10	14	100	
HA000128	1269	10	14	100	
HA000129	1270	10	14	100	
HA000130	1271	10	14	100	
HA000131	1272	10	14	100	
HA000132	1273	10	14	100	
HA000133	1274	10	14	100	
HA000134	1275	10	14	100	
HA000135	1276	10	14	100	
HA000136	1277	10	14	100	
HA000137	1278	10	14	100	
HA000138	1279	10	14	100	
HA000139	1280	10	14	100	
HA000140	1281	10	14	100	
HA000141	1282	10	14	100	
HA000142	1283	10	14	100	
HA000143	1284	10	14	100	
HA000144	1285	10	14	100	
HA000145	1286	10	14	100	
HA000146	1287	10	14	100	
HA000147	1288	10	14	100	
HA000148	1289	10	14	100	
HA000149	1290	10	14	100	
HA000150	1291	10	14	100	
HA000151	1292	10	14	100	
HA000152	1293	10	14	100	
HA000153	1294	10	14	100	
HA000154	1295	10	14	100	
HA000155	1296	10	14	100	
HA000156	1297	10	14	100	
HA000157	1298	10	14	100	
HA000158	1299	10	14	100	
HA000159	1300	10	14	100	
HA000160	1301	10	14	100	
HA000161	1302	10	14	100	
HA000162	1303	10	14	100	
HA000163	1304	10	14	100	
HA000164	1305	10	14	100	
HA000165	1306	10	14	100	
HA000166	1307	10	14	100	
HA000167	1308	10	14	100	
HA000168	1309	10	14	100	
HA000169	1310	10	14	100	
HA000170	1311	10	14	100	
HA000171	1312	10	14	100	
HA000172	1313	10	14	100	
HA000173	1314	10	14	100	
HA000174	1315	10	14	100	
HA000175	1316	10	14	100	
HA000176	1317	10	14	100	
HA000177	1318	10	14	100	
HA000178	1319	10	14	100	
HA000179	1320	10	14	100	
HA000180	1321	10	14	100	
HA000181	1322	10	14	100	
HA000182	1323	10	14	100	
HA000183	1324	10	14	100	
HA000184	1325	10	14	100	
HA000185	1326	10	14	100	
HA000186	1327	10	14	100	
HA000187	1328	10	14	100	
HA000188	1329	10	14	100	
HA000189	1330	10	14	100	
HA000190	1331	10	14	100	
HA000191	1332	10	14	100	
HA000192	1333	10	14	100	
HA000193	1334	10	14	100	
HA000194	1335	10	14	100	
HA000195	1336	10	14	100	
HA000196	1337	10	14	100	
HA000197	1338	10	14	100	
HA000198	1339	10	14	100	
HA000199	1340	10	14	100	
HA000200	1341	10	14	100	
HA000201	1342	10	14	100	
HA000202	1343	10	14	100	
HA000203	1344	10	14	100	
HA000204	1345	10	14	100	
HA000205	1346	10	14	100	
HA000206	1347	10	14	100	
HA000207	1348	10	14	100	
HA000208	1349	10	14	100	
HA000209	1350	10	14	100	
HA000210	1351	10	14	100	
HA000211	1352	10	14	100	
HA000212	1353	10	14	100	
HA000213	1354	10	14	100	
HA000214	1355	10	14	100	
HA000215	1356	10	14	100	
HA000216	1357	10	14	100	
HA000217	1358	10	14	100	
HA000218	1359	10	14	100	
HA000219	1360	10	14	100	
HA000220	1361	10	14	100	
HA000221	1362	10	14	100	
HA000222	1363	10	14	100	
HA000223	1364	10	14	100	
HA000224	1365	10	14	100	
HA000225	1366	10	14	100	
HA000226	1367	10	14	100	
HA000227	1368	10	14	100	
HA000228	1369	10	14	100	
HA000229	1370	10	14	100	
HA000230	1371	10	14	100	
HA000231	1372	10	14	100	
HA000232	1373	10	14	100	
HA000233	1374	1			

(表) 配列の統一

NCVAD3 モデル (結合情報を含む)

配列	位置	7桁の数字	配列の長さ	保存率	A*0301
WV000000	1586	10	13	93	
WV000001	1587	11	13	93	
WV000002	1588	12	13	93	
WV000003	1589	13	13	93	
WV000004	1590	14	13	93	
WV000005	1591	15	13	93	
WV000006	1592	16	13	93	
WV000007	1593	17	13	93	
WV000008	1594	18	13	93	
WV000009	1595	19	13	93	
WV000010	1596	20	13	93	
WV000011	1597	21	13	93	
WV000012	1598	22	13	93	
WV000013	1599	23	13	93	
WV000014	1600	24	13	93	
WV000015	1601	25	13	93	
WV000016	1602	26	13	93	
WV000017	1603	27	13	93	
WV000018	1604	28	13	93	
WV000019	1605	29	13	93	
WV000020	1606	30	13	93	
WV000021	1607	31	13	93	
WV000022	1608	32	13	93	
WV000023	1609	33	13	93	
WV000024	1610	34	13	93	
WV000025	1611	35	13	93	
WV000026	1612	36	13	93	
WV000027	1613	37	13	93	
WV000028	1614	38	13	93	
WV000029	1615	39	13	93	
WV000030	1616	40	13	93	
WV000031	1617	41	13	93	
WV000032	1618	42	13	93	
WV000033	1619	43	13	93	
WV000034	1620	44	13	93	
WV000035	1621	45	13	93	
WV000036	1622	46	13	93	
WV000037	1623	47	13	93	
WV000038	1624	48	13	93	
WV000039	1625	49	13	93	
WV000040	1626	50	13	93	
WV000041	1627	51	13	93	
WV000042	1628	52	13	93	
WV000043	1629	53	13	93	
WV000044	1630	54	13	93	
WV000045	1631	55	13	93	
WV000046	1632	56	13	93	
WV000047	1633	57	13	93	
WV000048	1634	58	13	93	
WV000049	1635	59	13	93	
WV000050	1636	60	13	93	
WV000051	1637	61	13	93	
WV000052	1638	62	13	93	
WV000053	1639	63	13	93	
WV000054	1640	64	13	93	
WV000055	1641	65	13	93	
WV000056	1642	66	13	93	
WV000057	1643	67	13	93	
WV000058	1644	68	13	93	
WV000059	1645	69	13	93	
WV000060	1646	70	13	93	
WV000061	1647	71	13	93	
WV000062	1648	72	13	93	
WV000063	1649	73	13	93	
WV000064	1650	74	13	93	
WV000065	1651	75	13	93	
WV000066	1652	76	13	93	
WV000067	1653	77	13	93	
WV000068	1654	78	13	93	
WV000069	1655	79	13	93	
WV000070	1656	80	13	93	
WV000071	1657	81	13	93	
WV000072	1658	82	13	93	
WV000073	1659	83	13	93	
WV000074	1660	84	13	93	
WV000075	1661	85	13	93	
WV000076	1662	86	13	93	
WV000077	1663	87	13	93	
WV000078	1664	88	13	93	
WV000079	1665	89	13	93	
WV000080	1666	90	13	93	
WV000081	1667	91	13	93	
WV000082	1668	92	13	93	
WV000083	1669	93	13	93	
WV000084	1670	94	13	93	
WV000085	1671	95	13	93	
WV000086	1672	96	13	93	
WV000087	1673	97	13	93	
WV000088	1674	98	13	93	
WV000089	1675	99	13	93	
WV000090	1676	100	13	93	
WV000091	1677	101	13	93	
WV000092	1678	102	13	93	
WV000093	1679	103	13	93	
WV000094	1680	104	13	93	
WV000095	1681	105	13	93	
WV000096	1682	106	13	93	
WV000097	1683	107	13	93	
WV000098	1684	108	13	93	
WV000099	1685	109	13	93	
WV000100	1686	110	13	93	
WV000101	1687	111	13	93	
WV000102	1688	112	13	93	
WV000103	1689	113	13	93	
WV000104	1690	114	13	93	
WV000105	1691	115	13	93	
WV000106	1692	116	13	93	
WV000107	1693	117	13	93	
WV000108	1694	118	13	93	
WV000109	1695	119	13	93	
WV000110	1696	120	13	93	
WV000111	1697	121	13	93	
WV000112	1698	122	13	93	
WV000113	1699	123	13	93	
WV000114	1700	124	13	93	
WV000115	1701	125	13	93	
WV000116	1702	126	13	93	
WV000117	1703	127	13	93	
WV000118	1704	128	13	93	
WV000119	1705	129	13	93	
WV000120	1706	130	13	93	
WV000121	1707	131	13	93	
WV000122	1708	132	13	93	
WV000123	1709	133	13	93	
WV000124	1710	134	13	93	
WV000125	1711	135	13	93	
WV000126	1712	136	13	93	
WV000127	1713	137	13	93	
WV000128	1714	138	13	93	
WV000129	1715	139	13	93	
WV000130	1716	140	13	93	
WV000131	1717	141	13	93	
WV000132	1718	142	13	93	
WV000133	1719	143	13	93	
WV000134	1720	144	13	93	
WV000135	1721	145	13	93	
WV000136	1722	146	13	93	
WV000137	1723	147	13	93	
WV000138	1724	148	13	93	
WV000139	1725	149	13	93	
WV000140	1726	150	13	93	
WV000141	1727	151	13	93	
WV000142	1728	152	13	93	
WV000143	1729	153	13	93	
WV000144	1730	154	13	93	
WV000145	1731	155	13	93	
WV000146	1732	156	13	93	
WV000147	1733	157	13	93	
WV000148	1734	158	13	93	
WV000149	1735	159	13	93	
WV000150	1736	160	13	93	
WV000151	1737	161	13	93	
WV000152	1738	162	13	93	
WV000153	1739	163	13	93	
WV000154	1740	164	13	93	
WV000155	1741	165	13	93	
WV000156	1742	166	13	93	
WV000157	1743	167	13	93	
WV000158	1744	168	13	93	
WV000159	1745	169	13	93	
WV000160	1746	170	13	93	
WV000161	1747	171	13	93	
WV000162	1748	172	13	93	
WV000163	1749	173	13	93	
WV000164	1750	174	13	93	
WV000165	1751	175	13	93	
WV000166	1752	176	13	93	
WV000167	1753	177	13	93	
WV000168	1754	178	13	93	
WV000169	1755	179	13	93	
WV000170	1756	180	13	93	
WV000171	1757	181	13	93	
WV000172	1758	182	13	93	
WV000173	1759	183	13	93	
WV000174	1760	184	13	93	
WV000175	1761	185	13	93	
WV000176	1762	186	13	93	
WV000177	1763	187	13	93	
WV000178	1764	188	13	93	
WV000179	1765	189	13	93	
WV000180	1766	190	13	93	
WV000181	1767	191	13	93	
WV000182	1768	192	13	93	
WV000183	1769	193	13	93	
WV000184	1770	194	13	93	
WV000185	1771	195	13	93	
WV000186	1772	196	13	93	
WV000187	1773	197	13	93	
WV000188	1774	198	13	93	
WV000189	1775	199	13	93	
WV000190	1776	200	13	93	
WV000191	1777	201	13	93	
WV000192	1778	202	13	93	
WV000193	1779	203	13	93	
WV000194	1780	204	13	93	
WV000195	1781	205	13	93	
WV000196	1782	206	13	93	
WV000197	1783	207	13	93	
WV000198	1784	208	13	93	
WV000199	1785	209	13	93	
WV000200	1786	210	13	93	
WV000201	1787	211	13	93	
WV000202	1788	212	13	93	
WV000203	1789	213	13	93	
WV000204	1790	214	13	93	
WV000205	1791	215	13	93	
WV000206	1792	216	13	93	
WV000207	1793	217	13	93	
WV000208	1794	218	13	93	
WV000209	1795	219	13	93	
WV000210	1796	220	13	93	
WV000211	1797	221	13	93	
WV000212	1798	222	13	93	
WV000213	1799	223	13	93	
WV000214	1800	224	13	93	
WV000215	1801	225	13	93	
WV000216	1802	226	13	93	
WV000217	1803	227	13	93	
WV000218	1804	228	13	93	
WV000219	1805	229	13	93	
WV000220	1806	230	13	93	
WV000221	1807	231	13	93	
WV000222	1808	232	13	93	
WV000223	1809	233	13	93	
WV000224	1810	234	13	93	
WV000225	1811	235	13	93	
WV000226	1812	236			

(表XVIの続き)

[illegible]

(表20の続き)

HCY A24 モチーフ (結合情報を含む)

配列	位置	アミノ酸の数	配列頻度	保存率 (%)	A*2401
THALVGGM	1864	8	12	86	
TSITYGKF	1287	8	13	93	
TSITYGKFL	1287	9	12	86..	
VFGLIHF	1586	8	13	93	0.0230
VAGSSYGF	2839	8	11	79	
VYLLPRPGFL	34	11	13	93	0.0016
WAKRLNF	1920	8	14	100	
YTHLDVSM	1422	10	14	100	
33		2			

【0382】

【表20】

HCV DR. 2-A-27-7

表 XIX^①[illegible]

表 XXb HCV DR3A モチーフ (結合領域モチーフ)

コグニティブ	例示的な配列	DR3	DR1	DR1=DR1	DR1=DR2	DR1=DR3	DR1=DR4	DR1=DR5	DR1=DR6	DR1=DR7	DR1=DR8	DR1=DR9	DR1=DR10
FLA00000	YNAAGGCGGAG		0.0001				0.0009						
FLA00001	TYGSLPTFTTET	-0.0017											
LEBP0000	APNLEGGDQDQD	-0.0017											
AMV00000	CGPAGGAGAGAG		0.0015				0.0014						
AMV00001	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
ML00000	YNAAGGCGGAG		0.0004				0.0008						
ML00001	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00000	YNAAGGCGGAG	1.0000					0.0014						
VAD00001	UTSALTQPSHIAET	0.0003					0.0008						
VAD00002	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00003	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00004	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00005	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00006	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00007	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00008	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00009	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00010	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00011	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00012	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00013	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00014	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00015	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00016	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00017	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00018	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00019	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00020	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00021	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00022	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00023	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00024	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00025	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00026	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00027	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00028	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00029	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00030	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00031	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00032	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00033	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00034	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00035	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00036	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00037	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00038	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00039	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00040	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00041	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00042	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00043	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00044	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00045	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00046	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00047	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00048	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00049	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00050	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00051	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00052	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00053	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00054	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00055	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00056	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00057	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00058	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00059	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00060	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00061	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00062	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00063	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00064	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00065	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00066	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00067	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00068	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00069	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00070	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00071	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00072	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00073	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00074	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00075	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00076	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00077	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00078	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00079	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00080	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00081	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00082	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00083	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00084	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00085	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00086	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00087	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00088	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00089	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00090	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00091	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00092	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00093	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00094	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00095	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00096	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00097	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00098	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00099	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						
VAD00100	UTSALTQPSHIAET		0.0004				0.0008						

19

【0385】

【表23】

表 XXc HCVJF 表 2

コト記列	コト頻度	コト保符号	例示の各記列	HCVJF 表 2 の位置	例示の各記列頻度	例示の各記列保符号
TSUNO	14	100	TSUNO	1235	14	100
FRUMBA	11	78	FRUMBA	2447	11	78
LAGHENA	13	42	LAGHENA	1178	11	42
LOTHIUT	11	78	LOTHIUT	1118	4	57
YUWITE	11	78	YUWITE	43	10	71
YUWITE	12	86	YUWITE	1132	10	71
ASTHNOT	11	78	ASTHNOT	1	11	78

【0386】

【表24】

表 XXI. 組み合わせたHLAスーパータイプでの集団の網羅

HLA スーパータイプ	表現型頻度					
	白人	北米の 黒人	日本人	中国人	アフリカ系 アメリカ人	平均
<u>a. 個々のスーパータイプ</u>						
A2	45.8	39.0	42.4	45.9	43.0	43.2
A3	37.5	42.1	45.8	52.7	43.1	44.2
B7	38.6	52.7	48.8	35.5	47.1	44.7
A1	47.1	16.1	21.8	14.7	26.3	25.2
A24	23.9	38.9	58.6	40.1	38.3	40.0
B44	43.0	21.2	42.9	39.1	39.0	37.0
B27	28.4	26.1	13.3	13.9	35.3	23.4
B62	12.6	4.8	36.5	25.4	11.1	18.1
B58	10.0	25.1	1.6	9.0	5.9	10.3
<u>b. 組み合わせたスーパータイプ</u>						
A2, A3, B7	83.0	86.1	87.5	88.4	86.3	86.2
A2, A3, B7, A24, B44, A1	99.5	98.1	100.0	99.5	99.4	99.3
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62, B58	99.9	99.6	100.0	99.8	99.9	99.8

SPRINGER

【0388】

【表26】

表 XXII

HCY 7 to 9"

[illegible]

(表XXIIの 続き)

HCV フォログ

AA	自己列	国産品名	HCV フォログ						
			A1 モターフ	A2 スーパー モターフ	A3 スーパー モターフ	A24 モターフ	B7 スーパー モターフ	I. スーパー モターフ	
9	CHRYSLER	40	N	Y	N	N	N		

【0389】

【表27】

表 XXIII. 同定したスーパースター群の免疫原性

免疫原性											
A2	アミノ酸配列	9ペプチド	Barnabai		ヒト		ヒトの免疫原性 ^b				
			患者	健康者	Chisari	Pape	全体	親株	変株		
A2	1073.05	LLFNILGWV	NS4	1812	1/6	7/17	2/21	0/6	10/50	0/6	6.4 (1.7)
	1090.18	FLILADARV	NS1/E2	728	2/6	7/17	1/21	0/6	10/50	5/6	9.5 (3.0)
	1013.02	VLVAQATV	NS4	1590	1/6	4/17	1/21	0/6	6/50	5/6	8.5 (3.7)
	1090.22	RLVFDLGV	NS5	2578	2/6	5/17	0/21	0/6	7/50	0/6	-
	1013.1002	DLMGVPLV	Core	132	2/6	7/17	1/21	1/6	11/50	5/6	8.8 (2.6)
	24.0073	WNRRLAFA	NS4	1920	1/6	3/17	2/21	1/6	7/50	0/6	-
	24.0075	VLVGSVLAA	NS4	1666	1/6	6/17	3/21	1/6	11/50	0/6	-
	1174.08	HWNFISGI	NS4	1769	3/6	3/17	2/21	0/6	8/50	0/6	6.4 (1.7)
	1073.06	ILAGYGAGV	NS4	1851	2/6	3/17	0/21	0/6	5/50	3/6	54.7 (3.3)
	1073.07	VLPRGPRLL	Core	35	2/6	5/17	7/21	1/6	17/50	4/6	59.1 (7.2)
	24.0071	LLFLILADA	NS1/E2	726	2/6	9/17	0/21	0/6	11/50	0/6	-
A3	13019	VLVTRHADV	NS3	1131	6/6	10/17	0/21	1/6	17/50	0/6	-
	13052	KTSERQPR	Core	51	2/16	1/4	3/12	0/6	6/38	3/6	23.4 (1.3)
	1073.11	RLGVRATRK	Core	43	4/16	1/4	7/12	1/6	13/38	3/6	42.2 (1.2)
	13053	QLFTSPRK	ENV	290	1/16	0/4	6/12	1/6	8/38	2/6	2.8 (1.1)
B7	1073.15	RMVYGGVEIR	NS1/E2	632	3/16	1/4	4/12	1/6	11/38	3/6	4.4 (1.1)
	13023	LIFCHSKRK	NS3	1396	6/16	1/4	4/12	2/6	13/38	6/6	56.5 (1.7)
	1073.10	QVAGALVAFK	NS4	1863	3/16	0/4	6/12	2/6	11/38	1/6	7.1
	24.0090	VAGALVAFK	NS4	1864	4/16	1/4	6/12	0/4	11/38	1/6	7.1
B7	24.0086	TLGEGAYMSK	NS3	1702	6/16	1/4	2/12	2/5	10/33	5	5
	1145.12	LFQCSFIR	Core	169			2	3/10			

【0390】

【表28】

表X X I V. 精製したMHC分子およびゲル濾過クロマトグラフィーを使用して確立した、ヒトおよびマウスのMHC-ペプチド結合アッセイ

B. グラスII 系結合アッセイ

ヒト	抗原	MHC分子	細胞株	抗原ペプチド		注記
				供給源	配列	
マウス	DR1	DRB1*0101	LEG7	HA Y107-319	YPKYVQNTKLKLT	最適pH: 4.5
	DR2	DRB1*1501	L466.1	MBP 88-102V	VNIHFQNTVTRITPPY	
	DR3	DRB1*1601	L242.5	非天然 (76-116)	YAAFAAATAAATA	
	DR4	DRB1*0301	MAT	MT GOLD T2-15	YKTAATDEARRK	
	DR6w10	DRB1*0401	Press	非天然 (717.01)	YARQSQITLTKQKT	
	DR6w14	DRB1*0402	YAK	非天然 (717.01)	YARQSQITLTKAAA	
	DR6w15	DRB1*0404	BNR 40	非天然 (717.01)	YARQSQITLTKQKT	
	DR7	DRB1*0405	K13	非天然 (717.01)	YARQSQITLTKQKT	
	DR8	DRB1*0701	Plood	Tet. tox. 830-843	QYIKANSKFGITE	
	DR9	DRB1*0802	OLL	Tet. tox. 830-843	QYIKANSKFGITE	
	DR10	DRB1*0803	LUY	Tet. tox. 830-843	QYIKANSKFGITE	
	DR11	DRB1*0901	HID	Tet. tox. 830-843	QYIKANSKFGITE	
	DR12	DRB1*1101	Swig	Tet. tox. 830-843	QYIKANSKFGITE	
	DR13	DRB1*1201	Herid	突出した非天然ペプチド	EALHQLKINPVLS	最適pH: 5.0
	DR15	DRB1*1302	H6301	Tet. tox. 830-843 S→A	QYIKANAKFGITE	
	DR31	DRB3*0101	GM3107株L4163	HA 307-319	PKYYKQNTLKLAT	
	DR32	DRB3*0201	L255.1	Tet. tox. 1272-1284	NQIQNDPNRDL	
	DR33	DRB3*0201	MAT	HA 307-319	YARQSQITLTKQKT	
	DR35	DRB3*0101	L257.6	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	
	DR31	DQA1*0301/DQB1*0301	PF	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	
	IA ^a		DB27.4	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	
	IA ^b		A20	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	
	IA ^c		CH-12	HEL 46-61	YNTDGTDTYGLQNSK	
ヒト	IA ^a		LS102.9	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	最適pH: 5.0
	IA ^b		91.7	非天然 (ROIV)	YAHAAHAAHAAHAA	
	IE ^a		A20	スレブリン7 12-26	YLEDARRKKAIYEKKK	
	IE ^b		CH-12	スレブリン7 12-26	YLEDARRKKAIYEKKK	

[0392]

[表30]

表 XXV. MHC精製において使用される
モノクローナル抗体

モノクローナル抗体	特異性
W632	HLAクラス I
B123.2	HLA-B*57:C
IVD12	HLA-DQ
LB3.1	HLA-DR
M1/42	H-2クラス I
28-14-8S	H-2 D ^b *57:L ^d
34-5-8S	H-2 D ^d
B8-24-3	H-2 K ^b
SF1-1.1.1	H-2 K ^d
Y-3	H-2 K ^b
10.3.6	H-2 IA ^k
14.4.4	H-2 IE ^d , IE ^k
MKD6	H-2 IA ^d
Y3JP	H-2 IA ^b , IA ^s , IA ^u

【0393】

【表31】

表 XXVI: HCV 由来の 保存された高アミノ酸 A*0201 結合ペプチド

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	A2スパン-917結合能力 (IC50 nM)				
					A*0201	A*0202	A*0203	A*6802	A2 XRN
1073.05	NS4	1812	LLFNILGGVV	85	4.2	113	3.2	19	33
1090.18	NS1/E2	728	FLILADARV	92	18	90	149	247	111
1013.02	NS4	1590	YLVAYQATV	85	20	39	16	82	33
1090.22	NS5	2611	RLVPPDLGV	79	56	391	10	370	8000
1013.1002	CORE	132	DLMGYFLV	79	80	4778	204	481	12
24.0073	NS4	1920	WNRRLJAFV	100	122	130	3.3	1609	400
24.0075	NS4	1666	VLVGGLAA	85	185	331	32	308	3077
1174.08	NS4	1769	HMWNFISGI	92	15	10750	77	132	7547
1073.06	NS4	1851	ILAGYGAGV	79	116	143	5.0	755	889
1073.07	CORE	35	YLLPRGGREL	92	125	6143	455	416	10256
24.0071	NS1/E2	726	LLFLLLADA	100	217	287	455	3364	3077
1.0119	LORF	1131	YLVTRHADV	85	455	2048	3.6	71	3077
24.0065	NS4	1891	ILSPQALVV	92	238	10750	27	1028	3077
1013.12	NS1/E2	686	ALSTGLIHL	85	313	7167	45	18500	10256
939.14	NS1/E2	696	HLHQNIVDV	85	500	3071	19	1370	10811
1090.21	NS5	2918	RLHGLSAFSL	79	179	782	625	18500	12500

【0394】

【表32】

表 XXVII: HCV 由来の保存された高アルゴリズム A*03 および A*11 結合ペプチド

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	A3 スペクトル結合能力 (IC50 nM)					
					A*03	A*11	A*3101	A*3301	A*6801	A3 XRN
1.0932	CORE	51	KTSESRQPR	92	69	94	67	1813	145	4
1073.11	CORE	43	RLGVRATRK	79	12	207	429	-	-	3
1.0935	ENV1	290	QLFTSPRR	79	15	182	621	3766	3	3
1073.13	NS1/E2	632	RMVYGVGEHR	100	15	300	95	9667	1778	3
1.0123	NS3	1396	HLFCHSKKK	100	20	32	2535	24167	333	3
1073.10	NS4	1863	GVAGALVAFK	85	28	4	3273	26364	118	3
24.0090	NS4	1864	VAGALVAFK	85	46	7	3750	11600	258	3
24.0086	NS3	1262	LGFGAYMSK	85	136	21	2950	22308	222	3
1174.16	NS1/E2	537	WMNSTGFTK	79	208	74	12857	690	1429	2
1073.14	NS3	1261	TLQFGAYMSK	85	136	98	-	22308	8889	2
1090.23	LORF	1183	AVCTRGVAK	79	423	240	16364	-	-	2
1090.24	NS5	2596	EVFCVQPEK	85	13750	222	-	-	18	2
24.0103	NS1/E2	647	AACNWTGRGR	85	36667	429	400	5273	4444	2
1073.16	NS3	1232	HLHAPTGSQK	85	19	2500	-	2857	-	1
1073.12	NS3	1395	HLFCHSKKK	100	423	-	20000	-	-	1
1090.26	NS3	1395	HLFCHSKKK	100	440	10000	-	-	8000	1

* 分析法、IC50nM > 30,000 を示す。

【0395】

【表33】

表 XXVIII: HCV 由来の保存された B*0702 結合ペプチド

A. 高い保存率の 9 マーおよび 10 マーのペプチド

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	B7-ペプチド結合能力 (IC50 nM)					
					B*0702	B*3501	B*51	B*5301	B*5401	B7 XRN
1145.12	Core	169	LPGCSFIF	92	28	90	100	114	6667	4
15.0048	E2	681	LPALSTGLI	85	157	-	2.8	1500	20000	2
15.0234	NS3	1620	KPTLHGPTPL	79	3.9	-	27500	-	-	1
15.0247	NS3	2835	APTLWARMIL	79	6.3	-	5500	-	-	1
15.0042	Core	99	SPRGSRPSW	79	14	-	11000	-	-	1
15.0039	Core	57	QPRGRQPI	92	24	-	-	-	-	1
15.0218	Core	37	LPRGPRLGV	92	29	-	6111	-	4000	1
15.0060	NS5	2615	SPQQRVEFL	79	46	-	27500	-	-	1
15.0043	Core	111	DPRRRRNIL	85	324	-	-	-	-	1
15.0063	NS5	2835	APTLWARMIL	79	344	-	4583	-	-	1
1292.17	NS5	2317	PPVVGCPPL	79	393	-	-	-	-	1
15.0239	NS4	1893	SPGALVGVV	79	423	-	3438	-	-	1
15.0235	NS3	1621	TPILYRLGAV	92	458	-	6875	-	909	1

【0396】

【表34】

表 XXVIII: HCV 由来の保存された B*0702 融合ペプチド

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	B7 スーパーマザーペプチドの結合能力 (IC50 nM)				
					B*0702	B*3501	B*51	B*5401	B7 XRN
29.0035	NS3	1378	IPFYGKAI	92	458	-	46	50	3
29.0040	Core	37	LPRRGRL	92	0.85	-	306	5000	2
29.0036	Core	137	IPLVGAFL	79	13	2250	79	2857	2
16.0187	NS1/E2	680	LPGCSFTLPA	64	423	24000	9167	15	2
29.0039	Core	169	LPGCSFSI	92	500	200	932	620	2
15.0219	Core	142	APLGGAARAL	71	9.5	-	-	12500	1
29.0031	NS5	2869	APTLWARM	79	13	-	4583	4348	1
15.0231	NS3	1512	RPSGMFSSV	71	153	-	-	-	1
29.0085	NS5	2474	LPINALNSL	57	220	18000	1170	11111	1
29.0037	NS5	2608	KPARLIVF	85	367	-	3235	16667	1
15.0237	NS4	1789	NPAIASLMAF	71	393	9000	5000	-	1
29.0118	NS5	2869	APTLWARMILM	79	423	-	-	3030	1
29.0042	NS4	1720	LPIYEQGM	85	423	-	1375	7692	1

C. B7 スーパーマザーペプチドの操作されたアナログ

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	B7 スーパーマザーペプチドの結合能力 (IC50 nM)				
					B*0702	B*3501	B*51	B*5401	B7 XRN
1145.12	Core	169	LPGCSFSIF	92	28	90	100	114	6667
1292.24	Core	169	LPGCSFSII	37	4364	5.3	262	1056	3
1145.13	Core	169	FPGCSFSIF	19	1.6	132	3.2	6.7	5

* データは、IC50 nM > 30,000 を表す。

[0397]

[表35]

表 XXIX: HCV 由来の A1- および A24- モチーフ含有ペプチド

A. A1 モチーフペプチド

ペプチド	分子	位置	配列	保存率	HLA-A*0101 結合 (IC50 nM)
13.0019	NS3	2922	LSAFSLHSY	79	31
1.0509	NS3	2921	GLSAFSLHSY	79	61
1069.62	NS3	1128	CTCGSSDLY	79	68
24.0093	NS5	2129	EVDGVRRLHRY	100	167
13.0016	NS3	1241	KSTKVPAAY	85	1923
1.0125	NS3	1525	CYDAGCAWY	79	4032
24.0008	E1	206	DCSNSIVY	85	16667
24.0094	NS5	2720	TNSKGQNCGY	100	-
24.0096	NS3	1240	GKSTKVPAAY	85	-
24.0100	NS3	1292	TGAPITYSTY	85	-
	NS3	1263	VAATLGFQAY	100	-
	NS5	2639	VMGSSYGFQY	79	-
	NS5	2640	MGSSYGFQY	79	-

デシムは、IC50 nM > 25000 を表す。

B. A24 モチーフペプチド

ペプチド	分子	位置	配列	保存率	HLA-A*2402 結合 (IC50 nM)
24.0092	NS4	1765	FWAKHMMWNF	85	1.7
13.0075	NS4	1778	QYLAGLSTL	100	250
1073.18	NS1/E2	636	MYVGGVEHRL	92	444
13.0074	NS3	1297	TYSTYKFL	85	522
13.0134	NS5	2647	QVSPGQRVEF	79	667
24.0091	NS4	1772	NFISGQYL	100	706
13.0131	Core	135	GYPLVGAPL	79	2105
24.0108	Core	173	SFSIFLLALL	100	2927
13.0132	NS3	1248	AYAAQGYKVL	79	13333
13.0133	NS4	1859	GYGAGVAGAL	85	-
1174.08	NS4	1769	HMMWNFISGI	93	-
	E1	317	RMAWDMMMNW	85	-
	NS1/E2	635	RMVYGGVEHRL	93	-
	NS3	1422	YYRGLDVSVI	100	-
	NS3	1468	DFSLDPTFTI	100	-
	NS3	1608	SWDQMWKCL	79	-
	NS3	1664	TWVLVGGVL	85	-
	NS4	1732	QFKQKALGL	85	-
	NS4	1732	QFKQKALGLL	85	-
	NS4	1765	FWAKHMMWNFI	85	-
	NS4	1919	QWMNRLIAF	100	-
	NS5	2241	LWRQEMGGNI	85	-
	NS5	2669	GFSYDTRCF	79	-
	NS5	2875	RMILMTHFF	85	-

デシムは、IC50 nM > 25000 を表す。

【0398】

【表36】

表 XXX: A2スーパ-タイプ交差反応性バインダーの免疫原性

バンド	配列	タンパク質	位置	免疫原性 ^a			トランスジェニックマウス ^b		
				Barnabai 感 應	接触者	Chisari	Pape	全体	頻度 応答
1073.05	LLFNILGGWV	NS4	1812	1/6	7/17	2/21	0/6	10/50	6/6
1090.18	FLILADARV	NS1/E2	728	2/6	7/17	1/21	0/6	10/50	5/6
1013.02	YLVAYQATV	NS4	1590	1/6	4/17	1/21	0/6	6/50	5/6
1090.22	RLIVFPDLGV	NS5	2578	2/6	5/17	0/21	0/6	7/50	0/6
1013.1002	DLNGYIPLV	Core	132	2/6	7/17	1/21	1/6	11/50	5/6
24.0073	WMNRLIATA	NS4	1920	1/6	3/17	2/21	1/6	7/50	0/6
24.0075	VLVGGVLA	NS4	1666	1/6	6/17	3/21	1/6	11/50	0/6
1174.08	HMWNFISGI	NS4	1769	3/6	3/17	2/21	0/6	8/50	6/6
1073.06	ILAGYGAGV	NS4	1851	2/6	3/17	0/21	0/6	5/50	3/6
1073.07	YLLPRGPRL	CORE	35	2/6	5/17	7/21	1/6	17/50	4/6
24.0071	LLFLILLADA	NS1/E2	726	2/6	9/17	0/21	0/6	11/50	0/6
1.0119	YLVTRHADV	NS3	1131	6/6	10/17	0/21	1/6	17/50	0/6

a. 示すデータは、試験した患者または接触者の総数に対する陽性の応答の数を表す。

b. 頻度は、試験したマウスの総数に対する陽性の応答の数を表す。応答は、換算単位で測定した陽性の動物における応答の平均の大きさ（標準偏差）を示す。

【0399】

【表37】

表 XXXI: A3スーパータイプ交差反応性バインダーの免疫原性

ペプチド	配列	タンパク質	位置	免疫原性						
				a		b				
				ヒト	Barnaba 発着 待配着	Chisari	全株	頻度 応答		
1.0952	KTSRSQPR	CORE	51	2/16	1/4	3/12	0/6	6/38	3/6	23.4 (1.3)
1073.11	RLGVRATRK	CORE	43	4/16	1/4	7/12	1/6	13/38	3/6	42.2 (1.2)
1.0955	QLFTFSRR	ENV	290	1/16	0/4	6/12	1/6	8/38		
1073.13	RMVYGGVEHR	NS1/E2	632	5/16	1/4	4/12	1/6	11/38	2/6	2.8 (1.1)
1.0123	LIFCHSKKK	NS3	1396	6/16	1/4	4/12	2/6	13/38	3/6	4.4 (1.1)
1073.10	GVAGALVAFK	NS4	1863	3/16	0/4	6/12	2/6	11/38	6/6	56.5 (1.7)
24.0090	VAGALVAFK	NS4	1864	4/16	1/4	6/12	0/4	11/38	1/6	7.1
24.0086	TLGFGAYMSK	NS3	1262	6/16		2/12	2/5	10/35		

a. 示すデータは、試験した患者または接触者の総数に対する陽性の応答の数を表す。
 b. 頻度は、試験したマウスの総数に対する陽性の応答の数を表す。応答は、換算単位で測定した陽性の動物における応答の平均の大きさ（標準偏差）を示す。

[0400]

[表38]

表XXXII. 候補 HCV 由来の HTL エピトープ

選択基準	ペプチド	自己列	供給源	保存率	
				全体	コア
A. DRスーパーモルフ を保存した15マー	1283.01	GGVGGVYLLPRRGPR	HCV Core 28	93	93
	1283.02	VYLLPRRGRLGVRA	HCV Core 34	93	93
	1283.03	GWLLSPRGSRPSWGPT	HCV Core 95	79	79
	1283.04	LGVYDILTCOFADL	HCV Core 119	79	86
	1283.05	IDTLTCOFADLMGYI	HCV Core 123	86	86
	1283.06	ADLMGVPLVGAFLG	HCV Core 131	79	79
	1283.07	GVRVLEGVNVATGN	HCV Core 154	86	86
	1283.08	GVNVATGNLPGCSFS	HCV Core 161	79	86
	1283.09	GCSFSILLALLSCL	HCV Core 171	86	100
	1283.10	GHRMAWDMAMWSPST	HCV E1 315	86	86
	1283.11	CGPVYCFITSPVYVG	HCV NS1/E2 306	93	93
	1283.12	VYCFITSPVYVGITD	HCV NS1/E2 309	93	93
	1283.13	GNWFGCTWNTGTGT	HCV NS1/E2 330	79	86
	1283.14	FTTLPALSTGLELHL	HCV NS1/E2 684	79	86
	1283.17	DLVLYTRHADVTPVR	HCV NS3 1134	79	79
	1283.18	RAAVCTRGVAKAVDF	HCV NS3 1186	79	79
	1283.20	AGGYKVLNLPVAA	HCV NS3 1251	79	100
	1283.21	GYKVLNLPVAAATL	HCV NS3 1253	100	100
	1283.22	VLVLNPSVAATLGG	HCV NS3 1256	100	100
	1283.23	GTVLDAQETAGARLV	HCV NS3 1335	86	86
	1283.24	GARLVVLATATPPGS	HCV NS3 1343	79	86
	1283.25	GRHLFCHSKKKCOE	HCV NS3 1393	100	100
	1283.27	DSVDFCNTCYTQTV	HCV NS3 1454	86	86
	1283.28	TVDFSLDPTFTETT	HCV NS3 1466	79	100
	1283.30	FTGLTHDAHFLSQI	HCV NS3 1567	93	93
	1283.31	YLVAYQATVCARAQA	HCV NS3 1591	79	93
	1283.32	KPTLHGPTPLLYRLG	HCV NS4 1620	79	79
	1283.33	LEVVTSTWVLVGGVL	HCV NS4 1658	86	86
	1283.34	TWVLVGGVLAALAY	HCV NS4 1664	86	86
	1283.35	AEQFKGKALGLLQTA	HCV NS4 1730	86	86
	1283.40	PAILSPGALVVGVC	HCV NS4 1889	79	93
	1283.41	GALVVGVCAILRR	HCV NS4 1895	79	79
	1283.42	CAAILRRHVGPGEA	HCV NS4 1903	79	79
	1283.43	AVQWMNRLIAFASRG	HCV NS4 1917	100	100
	1283.44	MNRLIAFASRGNHVS	HCV NS4 1921	86	100
	1283.48	ANLLWRQEMGGNITR	HCV NS5 2238	86	86
	1283.49	RQEMGGNITRVESEN	HCV NS5 2243	86	86
	1283.52	ARLVFPDLGVRVCE	HCV NS5 2610	79	79
	1283.53	FPDLGVRVCEKMALY	HCV NS5 2615	79	100
	1283.54	GVRVCEKMALYDVVS	HCV NS5 2619	79	100
	1283.56	QPEYDLELITSCSSN	HCV NS5 2808	79	93
	1283.57	LELITSCSSNVSAH	HCV NS5 2813	79	100
	1283.58	FTLWARMILMTHFFS	HCV NS5 2870	79	86
	1283.59	LHGLSAFSLHSYSPG	HCV NS5 2919	79	79
	1283.60	AFSLHSYSPGENRV	HCV NS5 2924	79	79

【0401】

【表39】

表 XXXII. 候補 HCV 由来の HTL エピトープ

選択基準	ペプチド	配列	供給源	保存率	
				全長	コア
B. 富士アミノ酸を 保存したコア	1283.15	VVLLFLLLADARVCS	HCV NS1/E2 724	29	100
	1283.16	SKGWRLAPITAQAQ	HCV NS3 1025	29	79
	1283.19	PQTQVAHLHPTGS	HCV NS3 1225	43	85
	1283.26	DVVVATDALMTGYT	HCV NS3 1436	43	79
	1283.29	WESVFTGLTHDAHF	HCV NS3 1563	43	92
	1283.45	LTSMLTDFSHITAET	HCV NS1 2176	57	100
	1283.46	ASQLSAPSLKATCTT	HCV NS5 2208	50	79
	1283.47	DADLIEANLLWRQEM	HCV NS5 2232	50	85
	1283.50	SYTWGALITPCAEE	HCV NS5 2456	64	79
	1283.51	TTIMAKNEVFCVQPE	HCV NS5 2589	64	85
	1283.55	GSSYGFQYSPGQRVE	HCV NS5 2641	71	79
C. 共同研究者	1283.61	ASCLRKLGVPLRVW	HCV NS5 2939	50	85
	F098.03	AAYAAQGYKVLVLPNSVAAT	HCV NS3 1262-1261	71	100
	F098.04	GYKVLVLPNSVAATLFGGAY	HCV NS3 1248-1267	100	
	F098.05	GYKVLVLPNSVAAT	HCV NS3 1248-1261	100	
	F134.01	RRPQDVKFGGGQVGGYY	HCV Core 17-35	86	
	F134.02	DVKFPGGGQVGGVYLLPRR	HCV Core 21-40	86	
	F134.03	GYKVLVLPNSVAATLFGGAY	HCV NS3 1253-1272	100	
	F134.04	TLHGPTLLYRLGAVQNEIT	HCV NS4 1622-1641		79
	F134.05	NFISGIQYLGLSTLPQNPFA	HCV NS4 1772-1791	100	
	F134.06	LLFNILGGWVAQAAPGAA	HCV NS4 1812-1831		86
	F134.07	GFEGGAVQWNRLLAFASRG	HCV NS4 1912-1931	86	100
	F134.08	GEGAVQWNRLLAFASRGNHV	HCV NS4 1914-1934	100	
	Page 21	AIPLEVIKGRHLIFCHSKR	HCV NS3 1379-1398	21	100
	Page 22	GRHLIFCHSKRKCDELATKL	HCV NS3 1388-1407		100
	Page 29	SVDCNTCVTQTVDFSLDPT	HCV NS3 1450-1469	86	
D. DR3 モチーフ	35.0102	GYRVLEDGVNYATGN	HCV 154	86	86
	35.0103	SAMYVGDLOGSVFLV	HCV 273	57	86
	35.0104	GHRMAWDMAMNWSFT	HCV 315	86	86
	35.0105	SDLYLVTIRHADVIPV	HCV 1133	79	86
	35.0106	VVVVATDALMTGYTG	HCV 1437	42	86
	35.0107	TVDFSLDPTFTIETT	HCV 1466	79	100
	35.0108	DSSVLCCEYDAGCAW	HCV 1518	71	93
	35.0109	GLPVCQDHLEFWESY	HCV 1552	42	86
	35.0110	GMQLAEQFKQKALGL	HCV 1726	57	86
	35.0111	PTHYVPESDAARVT	HCV 1936	86	86
	35.0112	GSQLPCEPEPDVAVL	HCV 2162	64	86
	35.0113	LTSMLTDFSHITAET	HCV 2176	57	100
	35.0114	MPPLGEGPDPLSD	HCV 2401	79	100
	35.0115	QPEYDLELITSCSN	HCV 2808	79	93
	1283.25	GRHLIFCHSKKKCDE	HCV NS3 1393-1407		

【0402】

【表40】

表 XXXIII. HLA-DR スクリーニングノブセル

スクリーニング ノブセル	抗原	対立遺伝子	代表的全アレル		発現型頻度				
			対立遺伝子	別名	Cauc.	Blk.	Jpn.	Chn.	Hisp. Avg.
一次	DR1	DRB1*0101-03	DRB1*0101	(DR1)	18.5	8.4	10.7	4.5	10.1
	DR4	DRB1*0401-12	DRB1*0401	(DR4w4)	23.6	6.1	40.4	21.9	29.8
	DR7	DRB1*0701-02	DRB1*0701	(DR7)	26.2	11.1	1.0	15.0	16.6
	ハザル合計				59.6	24.5	49.3	38.7	31.1
									44.6
二次	DR2	DRB1*1501-03	DRB1*1501	(DR2w2.B1)	19.9	14.8	30.9	22.0	15.0
	DR2	DRB5*0101	DRB5*0101	(DR2w2.B2)	-	-	-	-	-
	DR9	DRB1*0901,09012	DRB1*0901	(DR9)	3.6	4.7	24.5	19.9	6.7
	DR13	DRB1*1301-06	DRB1*1302	(DR6w19)	21.7	16.5	14.6	12.2	10.5
	ハザル合計				42.0	33.9	61.0	48.9	30.5
三次	DR4	DRB1*0405	DRB1*0405	(DR4w15)	-	-	-	-	-
	DR8	DRB1*0801-5	DRB1*0802	(DR8w2)	5.5	10.9	25.0	10.7	23.3
	DR11	DRB1*1101-05	DRB1*1101	(DR5w11)	17.0	18.0	4.9	19.4	18.1
	ハザル合計				22.0	27.8	29.2	29.0	29.4
四次	DR3	DRB1*0301-2	DRB1*0301	(DR3w17)	17.7	19.5	0.4	7.3	14.4
	DR12	DRB1*1201-02	DRB1*1201	(DR5w12)	2.8	5.5	13.1	17.6	5.7
	ハザル合計				20.2	24.4	13.5	24.2	19.7

【0403】

【表41】

表 XXXIV. 標的由来ペプチドのHLA-DR結合能力: DRスーパーモチーフおよび
アルゴリズム陽性ペプチド

ペプチド	配列	供給源	DR1	DR3w281	DR5w282	DR4w4	DR4w15	DR5w11	DR6w19	DR7	DR8w2	DR9	IAS	結合能力
1283.21	AAYAGQYKVLNRSVAATLFGAY	HCY NS3 1242-1267	4.5	350		5.2	567	143	5.1	89	288	54	175	9
1283.20	AGQYKVLNRSVAATLFGAY	HCY NS3 1251	6.0	650		7.9	224	74	5.9	133	175	375	298	9
F98.03	ANYAAQGYKVLNRSVAAT	HCY NS3 1241	2.6	46		14	87	103	11	96	60	240	298	9
F98.05	GYKVLNRSVAATLFGAY	HCY NS3 1244-1249	1.4	31		37	17	73	3.5	126	21	266	9	9
F98.04	GYKVLNRSVAATLFGAY	HCY NS3 1244-1267	3.5	42		5.7	199	240	4.1	21	80	20	8	8
1283.44	GEGAVQWNRLLAFASRGNIY3	HCY NS4 1914-1935	66	4.8		585	45	7.3	227	102	312	147	8	8
F134.08	KGWVRLIAFTAYAQ	HCY NS4 1914	3.2	12	381	245	345	221	158	962	51	384	8	6
1283.16	GSYVRYGPQRIE	HCY NS3 1028	0.34	129	23	24	12	4.8	19	156	54	384	8	8
1283.61	ASCELEGYPLEYVW	HCY NS3 2041	11	667	417	743	743	19	62	62	671	571	7	7
F134.05	NPISGQYLGLSTLKNPFA	HCY NS4 1772	10	217	686	84	29	29	82	671	671	411	6	6

注: IC50 > 200 nMは、
アルゴリズム陽性ペプチド。

[0404]

[表42]

表 XXXV. 3つの DR3 モチーフ含有ペプチドの
HLA-DR 結合能力

ペプチド	配列	供給源	DR3 結合 (IC50 nM)
35.0106	VVVVATDALMTGYTG	HCV 1437	427
35.0107	TVDFSLDPTFTIET	HCV 1466	235
1283.25	GRHLTFCHSKKKDE	HCV NS3 1393	ND

【0405】

【表43】

表 XXXVla: HCV 由来の CTL エピトープ候補

ペプチド	分子	第1の位置	配列	保存率	選択基準
1073.05	NS4	1812	LLFNILGGW	85	A22-16-947°
1090.18	NS1/E2	728	FLLADARV	92	A22-16-947°
1013.02	NS4	1590	YLVYQATV	85	A22-16-947°
1090.22	NS3	2611	RLVFPDLGV	79	A22-16-947°
1013.1002	CORE	132	DLMGVPLV	79	A22-16-947°
24.0073	NS4	1920	WMRLJAFV	100	A22-16-947°
24.0075	NS4	1666	VLVGGVLA	85	A22-16-947°
1174.08	NS4	1769	HMWNFISGI	92	A22-16-947°
1073.06	NS4	1851	ILAGYGAGV	79	A22-16-947°
1073.07	CORE	35	YLLPRGRFL	92	A22-16-947°
24.0071	NS1/E2	726	LLFLLADA	100	A22-16-947°
1.0119	LORF	1131	YLVTRHADV	85	A22-16-947°
1.0952	CORE	51	KTSESRQPR	92	A22-16-947°
1073.11	CORE	43	RLGVRAIRK	79	A22-16-947°
1.0955	ENV1	290	QLFTFSRR	79	A22-16-947°
1073.13	NS1/E2	632	RMVYGGVEHR	100	A22-16-947°
1.0123	NS3	1396	LIFCHSKKK	100	A22-16-947°
1073.10	NS4	1863	GVAGALVAFK	85	A22-16-947°
24.0090	NS4	1864	VAGALVAFK	85	A22-16-947°
24.0086	NS3	1262	TLGFGAYMSK	85	A22-16-947°
F104.01	NS5	3003	VGVLLPNR	79	A31
1143.12	CORE	169	LPGCSFSIF	92	B72-16-947°
29.0035	NS3	1378	IPFYGKAI	92	B72-16-947°
13.0019	NS5	2922	LSAFLSHSY	79	A1
1069.62	NS3	1128	CTCGSSDLV	79	A1
24.0092	NS4	1765	FWAKHMWNF	85	A24

【0406】

【表44】

表 XXXVIIb: HCV 由来の HTL エピトープ
候補

領域	ペプチド	モチーフ ¹	自己列
HCV NS3 1025-1039	1283.16	DR	SKGWRLAPITAAQ、
HCV NS3 1242-1267	F98.03	DR	AAAYAAQGYKVLNPSVAAT、
HCV NS3 1393-1407	1283.25	DR3	GRHLFCHSKKKGDE、
HCV NS3 1437-1451	35.0106	DR3	VVVVATDALMTGYTG、
HCV NS3 1466-1480	35.0107	DR3	TVDFSLDPTFTIET、
HCV NS4 1772-1790	F134.05	DR	NFISGIGYLAGLSTLGNPA、
HCV NS4 1914-1935	F134.08	DR	QEGAVQWNNRLIAPASRGNHV、
HCV NS5 2641-2655	1283.55	DR	GSSYGFOYSPGQORVE、
HCV NS5 2939-2953	1283.61	DR	ASCLRLGVPLQVW、

1. DR P1-P6 スーパーモチーフに基づいてか、または DR1-4-7 アルゴリズムの使用によって同定したペプチドを、「DR」によって示す。DR3 モチーフを使用して同定したペプチドを、「DR3」によって示す。

【0407】

【表45】

表 XXXVII. HCV 由来の HTL エピトープのパネルによる推定集団網羅

抗原	対立遺伝子	代表的な アッセイ	エピトープ の数 ²	集団網羅(表現型頻度)					
				Cauc.	Blk.	Jpn.	Chn.	Hisp.	Avg.
DR1	DRB1*0101-03	DR1	6	18.5	8.4	10.7	4.5	10.1	10.4
DR2	DRB1*1501-03	DR2w2.B1	3	19.9	14.8	30.9	22.0	15.0	20.5
DR2	DRB5*0101	DR2w2.B2	6	-	-	-	-	-	-
DR3	DRB1*0301-2	DR3	2	17.7	19.5	0.40	7.3	14.4	11.9
DR4	DRB1*0401-12	DR4w4	5	23.6	6.1	40.4	21.9	29.8	24.4
DR4	DRB1*0401-12	DR4w15	3	-	-	-	-	-	-
DR7	DRB1*0701-02	DR7	5	26.2	11.1	1.0	15.0	16.6	14.0
DR8	DRB1*0801-5	DR8w2	5	5.5	10.9	25.0	10.7	23.3	15.1
DR9	DRB1*09011.09012	DR9	3	3.6	4.7	24.5	19.9	6.7	11.9
DR11	DRB1*1101-05	DR5w11	5	17.0	18.0	4.9	19.4	18.1	15.5
DR13	DRB1*1301-06	DR6w19	2	21.7	16.5	14.6	12.2	10.5	15.1
合計				98.5	95.1	97.1	91.3	94.3	95.1

1. 全ての集団の網羅を、多くの人種集団における DRX の存在を考慮するよう調節した。DRX 対立遺伝子により表される特異性の範囲は、以前に特徴付けられた HLA-DR 対立遺伝子の特異性の範囲を反映することとを仮定した。各モチーフに組み込まれた DRX の割合は、その集団の残りにおけるモチーフの頻度の代表である。網羅の合計は、未知の遺伝子型を考慮するように調節されていない。

2. エピトープの数は、表 6 に示す エピトープのみを考慮して、最小の推定を表す。内包された エピトープによって恐らく結合されるさらなる対立遺伝子は、考慮されていない。

【0408】

【表46】

表 1a

スーパーモチーフ	位置	位置	位置
	2 (一次アンカー)	3 (一次アンカー)	C末端 (一次アンカー)
A1	T, I, L, V, M, S		F, W, Y
A2	V, Q, A, T		I, V, L, M, A, T
A3	V, S, M, A, T, L, I		R, K
A24	Y, F, W, I, V, L, M, T		F, I, Y, W, L, M
B7	P		V, I, L, F, M, W, Y, A
B27	R, H, K		F, Y, L, W, M, I, Y, A
B58	A, T, S		F, W, Y, L, I, V, M, A
B62	Q, L, I, V, M, P		F, W, Y, M, I, V, L, A
モチーフ			
A1	T, S, M		Y
A1		D, E, A, S	Y
A2.1	V, Q, A, T*		V, L, I, M, A, T
A3.2	L, M, V, I, S, A, T, F, C, G, D		K, Y, R, H, F, A
A11	V, T, M, L, I, S, A, G, N, C, D, F		K, R, H, Y
A24	Y, F, W		F, L, I, W

* 2がV, 2がQのば、C末端としてはいい。

太字の残基は好ましく、斜字の残基はさほど好ましくない：ペプチドが、上記表に特定するようなモチーフまたはスーパーモチーフのための各一次アンカー位置に一次アンカーを有する場合に、このペプチドはモチーフを保有するとみなされる。

FIGURE 1

【図面の簡単な説明】

【図1】

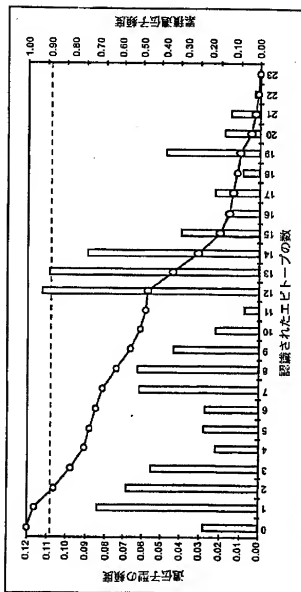
図1は、平均集団における、HLA-AおよびB分子により結合したHCV候補エпитオプの数の関数としての遺伝子型の総頻度のグラフを提供する。

【図2】

図2は、実験モデルのミニ遺伝子構築物中のペプチドエピトプの位置を示す。

【図1】

HCV候補エpiteープについてのモンテカルロ集団範囲分析



平均集団において、HLA-AおよびB対立遺伝子により結合されるHCV候補エpiteープの数の関数とした遺伝子型の総頻度のプロット。遺伝子型の値は、ヨーロッパ、北アメリカ人、黒人、日本人、中国人およびヒスパニック系集団における遺伝子頻度を平均することにより導出された。遺伝子型の累積頻度もまた示す。

現在利用可能なHLA分類データを用いて、遺伝子の存在割合（約15%）は、平均集団において示されていない。

遺伝子の100%評価のために、残りの割合を、HLA特定集団内のクラスターの相対頻度に基づいた各ヒット集団クラスターについて付加した。1つのペプチド（24,000%）は、今回の分析に組み込まなかった。

HCV三遺伝子

CTLエピソード

Kozak	SigSeq	コ7 43	NS4 1590	NS3 1128	NS5 2611	コ7 169	NS1/E2 632	NS4 1765	NS4 1863	コ7 132
		1073.11	1013.02	1069.62	1090.02	1145.12	1073.13	24.0092	1073.10	1013.10
		A3	A2	A1	A2	B7	A3	A24	A3	A2

NS3 1253	NS4 1921	1437	NS5 2641	1466
1283.21	1283.44	35.0106	1283.55	35.0107
DR	DR	DR3	DR	DR3

HTLエピソード

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/19774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(C) : A61K 38/00, 38/04, 38/08, 38/10, 39/29, 39/295 US CL : 514/2, 12, 13, 14, 15, 885; 424/185.1, 189.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 12, 13, 14, 15, 885; 424/185.1, 189.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, DERWENT WPI, WEST 2.0, search terms: author names, hcv, pepid7, HLA, hil, cd,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N
Y	WENTWORTH et al. Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice. Eur. J. Immunol. 1996. Vol 26, pages 97-101, see entire document.	1-29
Y	US 5,736,142 A (SETTE et al.) 07 April 1998, see entire document.	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents. "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" document published after the international filing date or prior date and not in conflict with the application but used to underline the principle or theory underlying the invention "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Z" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 17 OCT 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-3220		Authorized officer RON SCHWADRON Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 P	31/14	A 6 1 P 37/02	Z N A
	37/02	C 0 7 K 14/18	
C 0 7 K	14/18	A 6 1 K 37/02	
Z N A			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	サウスウッド, スコット アメリカ合衆国 カリフォルニア 92071, サンディエー, ストラスモア ドライブ 10679		
(72)発明者	リビングストン, ブライアン ディー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, チャコ コート 13555		
(72)発明者	チェスナット, ロバート アメリカ合衆国 カリフォルニア 92007, カーディフパーバイザーシー, キン グス クロス ドライブ 1473		
(72)発明者	ペイカー, デニス マリー アメリカ合衆国 カリフォルニア 92126, サン ディエゴ, カミニト ラバー ナンバー21 11575		
(72)発明者	セリス, エステバン アメリカ合衆国 ミネソタ 55902, ロ チェスター, ライト ロード エス, ダ ブリュー, 3683		
(72)発明者	クボ, ラルフ ディー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92009, カールスバッド, ペアー ツリー ド ライブ 6921		

(72)発明者 グレイ, ホワード エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, カミニト パティー 1461

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB11 CC06 CC07 CC16
CC35 EE59 FF11 FF68
4C084 AA01 AA02 AA14 BA01 BA08
BA17 BA18 BA22 BA23 CA01
MA05 MA66 NA05 NA10 NA13
NA14 ZA752 ZB072 ZB332
4H045 AA11 BA09 BA15 BA17 CA02
CA40 DA86 EA31 EA53 FA74